

Aus dem  
Neurowissenschaftlichen Forschungszentrum  
der Charité – Universitätsmedizin Berlin

# Dissertation

über

„Elektrophysiologische Untersuchungen zur  
physiologischen und pathologischen neuronalen Plastizität  
im *Subikulum*“

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)  
vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Christian Wozny  
aus Aachen

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. Denise Manahan-Vaughan  
2. Prof. Dr. Heiko Luhmann  
3. PD Dr. Joachim Behr

Datum der Promotion: 13.12.2004

# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Einleitung .....</b>   | <b>8</b>  |
| 1.1 Die Hippokampale Formation .....   | 9         |
| 1.2 Das Subikulum .....  | 9         |
| 1.3 Synaptische Plastizität .....  | 11        |
| 1.4 Kurzzeitplastizität – Doppelpulsverstärkung und -verminderung .....                                    | 11        |
| 1.5 Die Langzeitpotenzierung – Zelluläres Modell für Lernen und Gedächtnis .....                           | 12        |
| 1.6 Induktionsmechanismen der Langzeitpotenzierung .....   | 13        |
| 1.6.1 NMDA-Rezeptor abhängige Langzeitpotenzierung .....   | 13        |
| 1.6.2 NMDA-Rezeptor unabhängige Langzeitpotenzierung .....   | 14        |
| 1.7 Expressionsmechanismen der Langzeitpotenzierung .....  | 14        |
| 1.8 Synaptische Plastizität im Subikulum .....   | 15        |
| 1.9 Intrinsische Eigenschaften subikulärer Neurone .....   | 16        |
| 1.10 Pathologische Plastizität in chronisch epileptischem Gewebe .....                                     | 16        |
| <b>2. Fragestellung .....</b>  | <b>18</b> |
| <b>3. Material und Methoden .....</b>  | <b>19</b> |
| 3.1 Präparation der Hirnschnitte der Ratte und verwendete Lösung .....                                     | 19        |
| 3.2 Messkammer .....   | 19        |
| 3.3 Pilocarpin-Modell der Temporallappenepilepsie .....  | 20        |
| 3.4 Epilepsiechirurgische Resektate von Patienten mit pharmakoresistenter<br>Temporallappenepilepsie ..... | 21        |
| 3.5 Elektrophysiologische Untersuchungen .....   | 21        |
| 3.5.1 Extrazelluläre Messungen .....   | 21        |
| 3.5.2 Intrazelluläre Messungen .....   | 21        |
| 3.5.3 Reizelektroden .....   | 22        |

---

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 3.5.4     | Induktion einer Langzeitpotenzierung .....  | 22        |
| 3.6       | <i>Pharmaka</i> .....   | 22        |
| 3.7       | <i>Erfassung und Auswertung der Daten</i> .....   | 23        |
| <b>4.</b> | <b>Ergebnisse</b> .....   | <b>25</b> |
| 4.1       | <i>Extrazelluläre Ableitungen zur Langzeitpotenzierung im Subikulum der Ratte</i>                           | 25        |
| 4.2       | <i>Zellspezifische Langzeitpotenzierung im Subikulum der Ratte</i> .....                                    | 26        |
| 4.2.1     | Synaptische Langzeitpotenzierung unter Kontrollbedingungen .....  | 26        |
| 4.2.2     | APV-sensitive Langzeitpotenzierung in regulär feuernenden Zellen .....                                      | 29        |
| 4.2.3     | APV-insensitive Langzeitpotenzierung in Bursterzellen .....   | 33        |
| 4.2.4     | Einfluss des Kalziumchelators BAPTA auf die LTP in Bursterzellen und<br>regulär feuernenden Zellen .....    | 35        |
| 4.2.5     | Applikation des Glutamatantagonisten Kynurensäure .....   | 36        |
| 4.2.6     | NR2B-abhängige Potenzierung in Bursterzellen .....  | 37        |
| 4.2.7     | Rolle metabotroper Glutamatrezeptoren in subikulärer LTP .....  | 39        |
| 4.2.8     | Rolle von L-Typ Kalzium Kanälen in subikulärer LTP .....  | 40        |
| 4.2.9     | Rolle von Stickstoffmonoxid in subikulärer LTP .....  | 41        |
| 4.2.10    | cAMP-abhängige Expression der LTP in Bursterzellen .....  | 41        |
| 4.2.11    | Effekt von Forskolin in regulär feuernenden Zellen .....  | 44        |
| 4.2.12    | Rolle des H-Stromes in subikulärer LTP .....  | 45        |
| 4.3       | <i>Untersuchungen zur Kurzzeitplastizität im Subikulum der Ratte</i> .....                                  | 46        |
| 4.4       | <i>Charakterisierung des alveären Eingangs in das Subikulum in Pilocarpin-<br/>behandelten Tieren</i> ..... | 48        |
| 4.5       | <i>Langzeitpotenzierung in Pilocarpin-behandelten Tieren</i> .....  | 50        |
| 4.6       | <i>Charakterisierung humaner subikulärer Zellen</i> .....   | 53        |
| 4.7       | <i>Spontane epileptische Aktivität im humanen Subikulum</i> .....   | 54        |
| 4.8       | <i>Nachhyperpolarisation humaner subikulärer Zellen</i> .....   | 56        |
| <b>5.</b> | <b>Diskussion</b> .....   | <b>59</b> |
| 5.1       | <i>Zellspezifische Langzeitplastizität im Subikulum der Ratte</i> .....                                     | 59        |

---

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 5.2       | <i>Prä- versus postsynaptische Induktion der Langzeitpotenzierung</i> | 60        |
| 5.3       | <i>Beitrag von NMDA-Rezeptoren zur LTP in subikulären Zellen</i>      | 61        |
| 5.4       | <i>Expressionsmechanismen subikulärer LTP</i>                         | 63        |
| 5.5       | <i>Pathologische Plastizität in Pilocarpin-behandelten Tieren</i>     | 64        |
| 5.6       | <i>Pathologische Plastizität im humanem Subikulum</i>                 | 66        |
| <b>6.</b> | <b>Zusammenfassung</b>  | <b>69</b> |
|           | <b>Literaturverzeichnis</b>   | <b>70</b> |
|           | <b>Anhang</b>   | <b>81</b> |
|           | <i>Patientendaten humanes Gewebe</i>                                  | 81        |
|           | <i>Eidesstattliche Erklärung</i>                                      | 82        |
|           | <i>Danksagung</i>   | 83        |
|           | <i>Publikationsliste</i>  | 84        |
|           | <i>Symposiumsbeiträge</i>   | 85        |

## Abkürzungsverzeichnis:

|                        |   |
|------------------------|---|
| <b>AHS</b>             | Ammonshornsklerose  |
| <b>ALV</b>             | Alveus  |
| <b>AMPA</b>            | $\alpha$ -Amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionsäure          |
| <b>AMPAR</b>           | $\alpha$ -Amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionsäure Rezeptor |
| <b>APV</b>             | <i>D,L</i> -2-Amino-5-phosphonovaleriansäure                          |
| <b>BCM</b>             | Bicuculline methiodide  |
| <b>Ca<sup>2+</sup></b> | Kalzium   |
| <b>CA1</b>             | Area Cornu Ammonis 1  |
| <b>CA3</b>             | Area Cornu Ammonis 3  |
| <b>cAMP</b>            | zyklisches Adenosin 3',5'-monophosphat                                |
| <b>CNQX</b>            | 6-Cyano-7-nitro-quinoxalin-2-3-dione                                  |
| <b>DG</b>              | Gyrus dentatus  |
| <b>EC</b>              | entorhinaler Kortex   |
| <b>EPSP</b>            | exzitatorisch postsynaptisches Potential                              |
| <b>fAHP</b>            | schnelle (fast) Nachhyperpolarisation                                 |
| <b>fp</b>              | Feldpotential   |
| <b>HC</b>              | Hippokampus   |
| <b>LTD</b>             | Langzeitdepression  |
| <b>LTP</b>             | Langzeitpotenzierung  |
| <b>mM</b>              | Millimol/Liter  |
| <b>NBQX</b>            | 2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzol[f]quinoxalin-7-sulfonamid  |
| <b>NMDA</b>            | N-Methyl-D-aspartat   |

---

|                                   |                                       |
|-----------------------------------|---------------------------------------|
| <b>NMDAR</b>                      | N-Methyl-D-aspartat Rezeptor          |
| <b>NO</b>                         | Stickstoffmonoxid                     |
| <b>NR2B</b>                       | NMDA-Rezeptor Untereinheit 2B         |
| <b>PKA</b>                        | Proteinkinase A                       |
| <b>PTP</b>                        | posttetanische Potenzierung           |
| <b>Rab3A</b>                      | Synaptisches Vesikelprotein           |
| <b>RIM1<math>\alpha</math></b>    | Synaptisches Vesikelprotein           |
| <b>RMP</b>                        | Ruhemembranpotential                  |
| <b>sAHP</b>                       | langsame (slow) Nachhyperpolarisation |
| <b>SD</b>                         | Standardabweichung                    |
| <b>SEM</b>                        | Standardfehler                        |
| <b>Sub</b>                        | Subikulum                             |
| <b>TLE</b>                        | Temporallappenepilepsie               |
| <b><math>\mu\text{M/l}</math></b> | Mikromol/Liter                        |

# 1. *Einleitung*

Das Gehirn zählt über 100 Milliarden Nervenzellen, die miteinander kommunizieren und so Bewegungsabläufe steuern, Sinnesempfindungen modulieren und nicht zuletzt kognitive Prozesse wie Lernen, Gedächtnis, Wahrnehmung und Aufmerksamkeit ermöglichen. Doch wie werden Gedächtnisinhalte gespeichert und wie werden sie wieder abgerufen? Spielen einzelne Hirnregionen in diesem Zusammenhang eine besondere Rolle und welche zellulären Prozesse liegen diesen Funktionen zugrunde?

In den Fünfziger Jahren des letzten Jahrhunderts richtete sich das Augenmerk besonders auf Patienten mit einer Temporallappenepilepsie, die sich bei Versagen einer medikamentösen Therapie einer neurochirurgischen Operation unterzogen. Im Jahr 1953 resizierte der Neurochirurg W. B. Scoville dem Patienten H. M. beidseits dessen Hippokampi. Infolge dieser sogenannten bilateralen Hippokampektomie litt der Patient H. M. unter schweren Gedächtnisstörungen, die vor allem das *explizite* oder *deklarative* Gedächtnis, genauer das *episodische* (biografische, zeitliche und örtliche Informationen betreffend) und *semantische* Gedächtnis (z.B. Faktenwissen), stark beeinträchtigten. Das *implizite* oder *non-deklarative* Wissen, wie der Erwerb motorischer Fähigkeiten, war bei diesem Patienten nicht gestört. Aus dieser Patientenbeschreibung folgte man, dass der hippokampalen Formation eine zentrale Rolle in der deklarativen Gedächtnisbildung zugeordnet werden kann (Scoville & Milner, 1957). Nachfolgende Studien belegten, dass das Langzeitgedächtnis von H. M. schwer gestört war, aber sein Kurzzeitgedächtnis sowie der Erwerb sensomotorischer Fähigkeiten postoperativ unbeeinträchtigt waren (Corkin, 2002).

Weitere Hinweise auf eine zentrale Rolle des Hippokampus in der Gedächtnisbildung geben Patienten mit zerebralen Ischämien. Mittels moderner Bildgebung (z.B. MRT) oder neuropathologischer Diagnostik können und konnten funktionell neuroanatomische Zusammenhänge geklärt werden. Es zeigte sich, dass Patienten mit zerebralen Ischämien, deren Schädigungsausmaß lediglich den Hippokampus betraf, unter schweren Gedächtnisstörungen litten (Zola-Morgan *et al.*, 1986). Im Tiermodell konnten diese Ergebnisse bestätigt werden (Zola-Morgan *et al.*, 1992).



## 1.1 Die Hippokampale Formation

Der entorhinale Kortex (EC) bildet das Eingangstor zum Hippokampus. Sternzellen der Schicht II des entorhinalen Kortex erregen über den Tractus perforans Körnerzellen in der Area dentata (DG), die wiederum über Moosfasern in die Area CA3 projizieren. Pyramidale Neurone der Area CA3 senden ihre Efferenzen über die Schafferschen Kollateralen in die Area CA1, deren Axone in das Subikulum (Sub) ziehen (Abbildung 1). Das Subikulum bildet schließlich die Ausgangsstruktur der hippokampalen Formation und projiziert zu verschiedenen kortikalen und subkortikalen Regionen (Amaral & Witter, 1989).

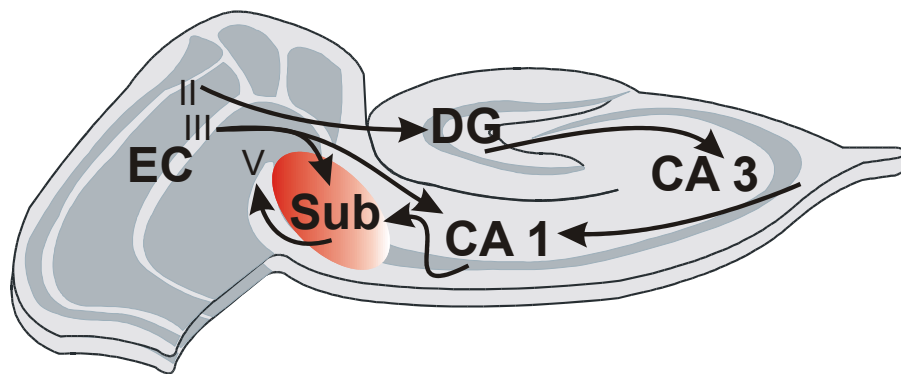


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Hirnschnittpräparates (verändert nach Witter).

## 1.2 Das Subikulum

Das Subikulum nimmt innerhalb der hippokampalen Formation eine wichtige Schaltfunktion ein. Informationen aus der Area CA1 werden in den entorhinalen Kortex und in verschiedene subkortikale Areale wie z.B. den Nucleus accumbens oder den Thalamus weitergeleitet (Witter & Groenewegen, 1990). Der entorhinale Kortex wiederum sendet Efferenzen über den temporoammonischen Weg in das Subikulum. Das Subikulum ist somit in verschiedene Schaltkreise eingebunden. Es stellt die Endstation der entorhinal-hippokampalen Schleife dar und bildet mit dem entorhinalen Kortex eine rekurrente Verschaltung. Diese Lage unterstreicht die Schaltfunktion des Subikulums. Die Abbildung 2 fasst die wichtigsten Afferenzen und Efferenzen des Subikulums zusammen.

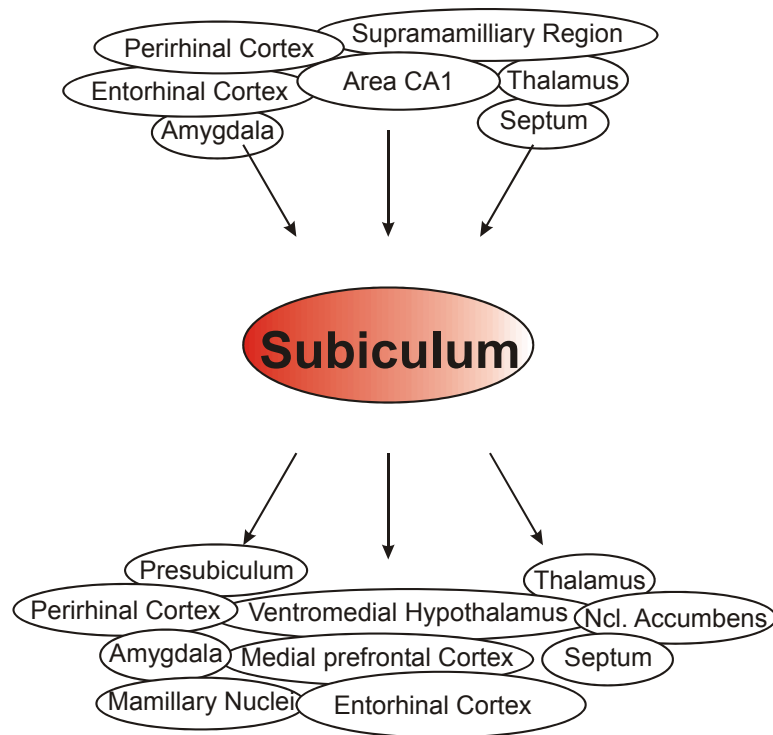


Abb. 2: Afferente und efferente Verschaltung des Subikulums (verändert nach Greene).

Das Subikulum unterscheidet sich hinsichtlich seiner elektrophysiologischen Eigenschaften deutlich von den anderen Regionen der hippocampalen Formation. Es besitzt einen hohen Anteil von pyramidalen Bursterzellen („bursting cells“). Eine Bursterzelle antwortet auf einen depolarisierenden Strompuls mit einem „burst“ von 2-5 Aktionspotentialen. Ca. 2/3 der Pyramidenzellen zeigen diese Eigenschaft, während 1/3 der Zellen auf einen depolarisierenden Strompuls lediglich mit einem Aktionspotential antworten. Sie werden als regulär feuernde Zellen („regular firing cells“) bezeichnet (O'Mara *et al.*, 2001). Obgleich ihre elektrophysiologischen Eigenschaften unterschiedlich sind, konnten keine morphologischen Unterschiede zwischen Bursterzellen und regulär feuernenden Zellen festgestellt werden (Greene & Totterdell, 1997; Knopp *et al.*, 2004). Die Funktion dieser beiden Zelltypen hinsichtlich der Neurotransmission ist unbekannt. Bursts von Aktionspotentialen wird eine besondere Rolle in der neuronalen Informationsübertragung zugeschrieben (Lisman, 1997). Sie sind an physiologischen Prozessen wie z.B. synaptischer Plastizität (Pike *et al.*, 1999) und visueller Informationsverarbeitung (Livingstone *et al.*, 1996) beteiligt und spielen z.B. in der Pathogenese einer Epilepsie eine bedeutende Rolle (Yaari & Beck, 2002). Zudem konnte gezeigt werden, dass Bursterzellen selektiv in das Präsubikulum und regulär feuernde Zellen zum entorhinalen Kortex projizieren (Stewart, 1997).

### 1.3 Synaptische Plastizität

Neuronale Plastizität ist eine Grundlage für die regelgerechte Entwicklung und Funktion des zentralen Nervensystems. Der Begriff Plastizität wird in vielerlei Hinsicht gebraucht. Man unterscheidet eine physiologische von einer pathologischen Plastizität. Die physiologische Plastizität beschreibt Veränderungen im Rahmen physiologischer Prozesse wie Lernen und Gedächtnis. Der Begriff pathologische Plastizität umfasst eine Vielfalt von Veränderungen in sich in einem krankhaft veränderten Gehirn wie z.B. im Rahmen einer Temporallappenepilepsie abspielen. Man unterscheidet Veränderungen auf intrinsischer, synaptischer, morphologischer und genetischer Ebene.

Intrinsische Plastizität manifestiert sich in Veränderungen der Membraneigenschaften eines Neurons wie z.B. in Veränderungen des Entladungsverhaltens. Synaptische Plastizität betrifft Veränderungen in der Neurotransmission, d.h. der Informationsübertragung zwischen zwei oder mehreren Nervenzellen. Diese Veränderungen der synaptischen Transmission können transient oder persistierend sein. Einige Millisekunden anhaltende Veränderungen der synaptischen Transmission werden als Kurzzeitplastizität beschrieben. Sie können assoziiert sein mit Veränderungen des Kurzzeitgedächtnisses oder mit kurzanhaltenden Adaptationsprozessen sensorischer Informationen. Minuten bis Tage anhaltende Veränderungen werden unter dem Begriff Langzeitplastizität zusammengefasst. Sie spielen in der neuronalen Entwicklung sowie dem Langzeitgedächtnis eine tragende Rolle.

Diesen langanhaltenden Veränderungen liegen sehr häufig morphologische und genetische Prozesse zugrunde. Morphologische Plastizität zeigt sich z.B. in Veränderungen der Dornfortsätze, die auf dendritischen Ausläufern den direkten Kontakt zwischen zwei Nervenzellen gewährleisten. Diese können sich infolge von Lernprozessen teilen (Nikonenko *et al.*, 2002; Yuste & Bonhoeffer, 2001).

### 1.4 Kurzzeitplastizität – Doppelpulsverstärkung und -verminderung

Formen der synaptischen Plastizität, die wenige Millisekunden oder Sekunden anhalten, werden als Kurzzeitplastizität bezeichnet. Folgt auf einen synaptischen Reiz in kurzen Abfolge (in Millisekunden) ein zweiter Reiz, so kann die synaptische Antwort vergrößert, gleichbleibend oder verkleinert sein. Man unterscheidet also eine

Faszilitierung (Verstärkung) von einer Depression (Verminderung). Die Verstärkung kann in den meisten Fällen durch einen präsynaptischen Prozess erklärt werden. Bei dem ersten synaptischen Puls strömt Kalzium in die Präsynapse und bewirkt die Transmitterfreisetzung. Die Kalziumkonzentration in der Präsynapse ist nun gegenüber der basalen Konzentration erhöht. Folgt ein zweiter Puls bevor die Kalziumkonzentration wieder den basalen Wert erreicht hat (man spricht von residualem Kalzium), so kann bei erneutem Einstrom von Kalzium vermehrt Transmitter freigesetzt werden. Die zweite synaptische Antwort ist größer als die erste, sie ist faszilitiert. Ändert sich der Doppelpulsindex (Division der Amplitude der zweiten durch die erste synaptische Antwort) nach tetanischer Reizung oder nach Applikation einer Droge, so kann dies einen Hinweis auf einen präsynaptischen Effekt geben (Debanne *et al.*, 1996).

Eine Doppelpulsdepression beruht in der Regel auf einer Verarmung an Transmittermolekülen (des sogenannten „ready-releasable pools“) der Präsynapse (Zucker & Regehr, 2002). Postsynaptische Rezeptordesensibilisierung kann ebenfalls eine Doppelpulsdepression nach sich ziehen (Jones & Westbrook, 1996). Darüber hinaus können präsynaptisch lokalisierte Rezeptoren, wie z.B. Kainat- oder metabotrope Glutamatrezeptoren, die Transmitterfreisetzung vermindern (MacDermott *et al.*, 1999; Manzoni *et al.*, 1995; Schmitz *et al.*, 2001).

## **1.5 Die Langzeitpotenzierung – Zelluläres Modell für Lernen und Gedächtnis**

Eine wesentliche Eigenschaft erregender Synapsen des Zentralnervensystems ist die Fähigkeit zur Ausbildung einer aktivitätsabhängigen, lang andauernden Verstärkung synaptischer Aktivität. Dieses, als Langzeitpotenzierung (LTP) bezeichnete Phänomen ist ein allgemein anerkanntes zelluläres Modell für Formen des Lernens und des Gedächtnisses (Bliss & Collingridge, 1993; Malenka & Nicoll, 1999). Es wurde erstmals 1973 im Hippokampus beschrieben (Bliss & Lomo, 1973). Repetitive hochfrequente Stimulation präsynaptischer Nervenzellen führt zu einer langanhaltenden Erhöhung exzitatorisch postsynaptischer Potentiale (EPSPs). Erst kürzlich konnten Rioult-Pedotti und Kollegen zeigen, dass eine LTP auch tatsächlich bei Lernvorgängen im Gehirn stattfindet (Rioult-Pedotti *et al.*, 2000).

## 1.6 Induktionsmechanismen der Langzeitpotenzierung

### 1.6.1 NMDA-Rezeptor abhängige Langzeitpotenzierung

Die Induktion von LTP benötigt in der Regel die Aktivierung von postsynaptischen N-Methyl-D-aspartat-(NMDA)-Rezeptoren und den dadurch bedingten Einstrom von Kalziumionen in das postsynaptische Neuron. Der NMDA-Rezeptor wird beim Ruhemembranpotential durch Magnesiumionen blockiert. Die Blockade kann nur aufgehoben werden, wenn die postsynaptische Zelle ausreichend depolarisiert wird, z.B. durch die Aktivierung von  $\alpha$ -Amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazolepropionsäure-(AMPA)-Rezeptoren.

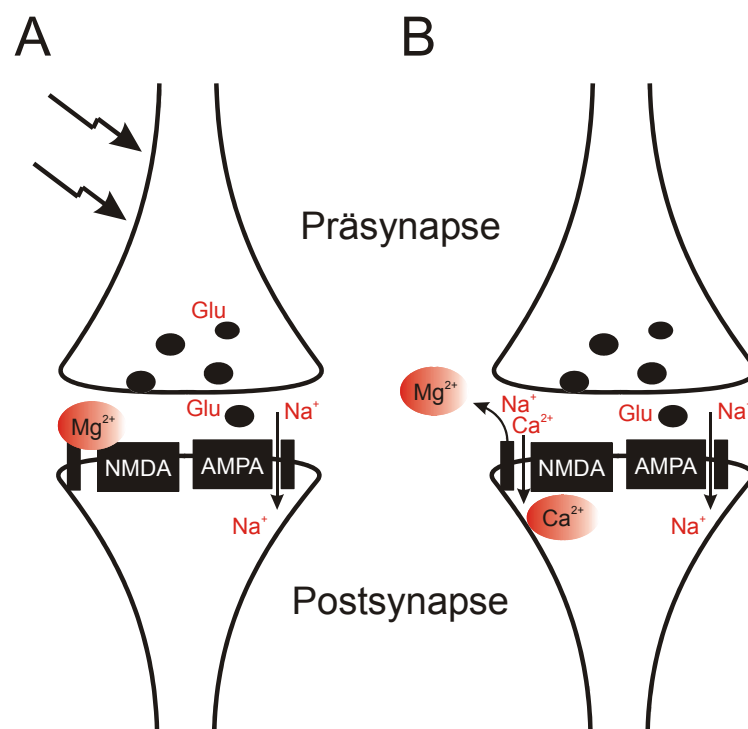


Abb. 3: LTP Induktionsmechanismus: Die tetanische Reizung führt zu einer vermehrten Transmitterfreisetzung von Glutamat (A). Über eine Aktivierung von AMPAR wird die postsynaptische Zelle ausreichend depolarisiert um den spannungsabhängigen Magnesiumblock der NMDA-Rezeptoren aufzuheben und den Rezeptor für Natrium- und Kalziumionen durchlässig zu machen (B).

Durch die Depolarisation wird der Magnesiumblock des NMDA-Rezeptors aufgehoben und ermöglicht den Einstrom von Natrium- und insbesondere von

Kalziumionen (Abbildung 3). Kalzium initiiert eine langanhaltende Verstärkung der synaptischen Übertragung durch eine Reihe von Second-Messenger-Kaskaden.

### 1.6.2 NMDA-Rezeptor unabhängige Langzeitpotenzierung

Für die hippokampalen Moosfasersynapsen (Zalutsky & Nicoll, 1990), die Parallelfasern des Kleinhirns (Salin *et al.*, 1996), sowie die kortikothalamischen Synapsen (Castro-Alamancos & Calcagnotto, 1999) konnte gezeigt werden, dass die Induktion von LTP unabhängig vom NMDA-Rezeptor ist. Die präsynaptisch induzierte und exprimierte Moosfaser-LTP erfolgt über die Aktivierung der Kalzium-Calmodulinsensitiven Adenylcyclase I, den nachfolgenden Anstieg von Adenosine 3',5'-monophosphat (cAMP) (Weisskopf *et al.*, 1994) und die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). Der weitere Signaltransduktionsweg nach Aktivierung der PKA ist bislang nicht eindeutig geklärt. Die PKA könnte den Kationenkanal  $I_h$  modulieren, wodurch die Zelle depolarisiert wird und vermutlich über einen vermehrten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom die vesikuläre Freisetzungswahrscheinlichkeit erhöht (Huang & Hsu, 2003; Mellor *et al.*, 2002), aber siehe (Chevalleyre & Castillo, 2002). Darüber hinaus sind präsynaptische, vesikelassoziierte Proteine wie das Rab3A und RIM1 $\alpha$  an der Moosfaser-LTP beteiligt, wie anhand von Knockout-Tieren gezeigt werden konnte (Castillo *et al.*, 1997; Castillo *et al.*, 2002). Eine mögliche Aktivierung präsynaptischer Kainat-Rezeptoren wird ebenfalls diskutiert (Bortolotto *et al.*, 1999; Bortolotto *et al.*, 2003; Contractor *et al.*, 2001; Schmitz *et al.*, 2003).

## 1.7 Expressionsmechanismen der Langzeitpotenzierung

Für die Expression der LTP existieren Hinweise für sowohl prä- als auch postsynaptische Mechanismen. Postsynaptisch wird die Phosphorylierung sowie der Einbau von AMPA-Rezeptoren als wesentlicher Mechanismus der LTP-Expression angesehen (Abbildung 4).

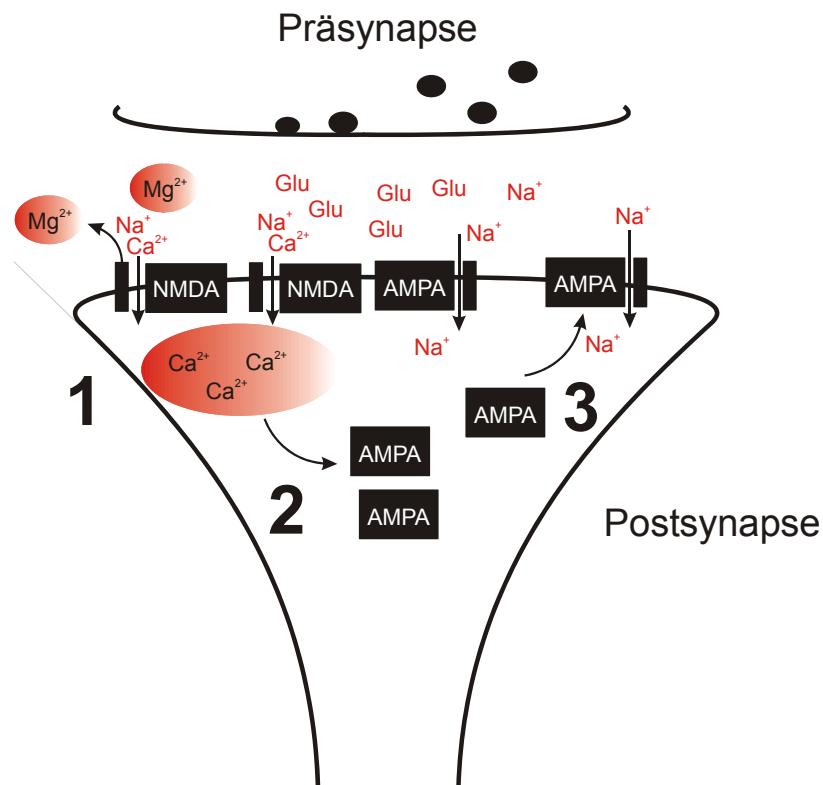


Abb. 4: LTP Expressionsmechanismus: Ein vermehrter Kalziumeinstrom (1) in die postsynaptische Zelle führt über second-messenger-Kaskaden (2) zu einem Einbau von zusätzlichen AMPA-Rezeptoren in die postsynaptische Membran (3).

Zudem werden verschiedene retrograde Messenger diskutiert, welche nach postsynaptischer Induktion der LTP zu einer präsynaptischen Expression führen. Hierzu gehören insbesondere Stickstoffmonoxid (NO) (O'Dell *et al.*, 1991) und Endocannabinoide (Carlson *et al.*, 2002).

## 1.8 Synaptische Plastizität im Subikulum

Während die LTP und ihre Mechanismen im Gyrus dentatus, in den Areae CA3 und CA1 ausführlich untersucht worden sind, gibt es bislang nur wenig Daten über die synaptische Plastizität des Subikulums. Das Subikulum gilt als die wesentliche Ausgangsstruktur der hippocampalen Formation und leitet neuronale Informationen der Area CA1 in verschiedene kortikale und subkortikale Hirnregionen. Unter funktionell anatomischen Gesichtspunkten ist diese Struktur somit von besonderer Bedeutung für die Verarbeitung und Weiterleitung von Gedächtnisinhalten. Läsionsstudien konnten in

der Tat eine wesentliche Funktion dieser Struktur beim räumlichen Lernen und Gedächtnis zeigen (Morris et al., 1990).

*In vitro*-Untersuchungen zeigten sowohl eine NMDA-abhängige (Boeijinga & Boddeke, 1996) wie auch NMDA-unabhängige (Kokaia, 2000) Form der LTP im Subikulum. Hinweise auf eine präsynaptische Expression der LTP fanden sich in *in vivo*-Ableitungen, die eine Änderungen des Doppelpulsindex, d.h. der Kurzzeitplastizität nach Induktion der LTP registrierten (Commins et al., 1998). Der genaue Induktions- und Expressionsmechanismus ist bislang nicht untersucht worden.

## **1.9 Intrinsische Eigenschaften subikulärer Neurone**

Wie bereits in Kapitel 1.2 erwähnt, unterscheidet man im Subikulum der Ratte zwei unterschiedliche Pyramidalzellen: regulär feuernde Zellen und Bursterzellen.

Beide Zelltypen zeigen nach einem langandauernden depolarisierenden Strompuls eine Nachhyperpolarisation. Es konnte gezeigt werden, dass Bursterzellen lediglich eine schnelle Nachhyperpolarisation (fAHP) zeigen, aber keine langsame Komponente (sAHP). Regulär feuernde Zellen zeigen hingegen beide Formen der Nachhyperpolarisation (Behr *et al.*, 1996). Nachhyperpolarisationen haben zum einen die Funktion die Entladungsrate eines Neurons zu limitieren und zum anderen sind sie verantwortlich für das Phänomen der Frequenzadaptation (Sah, 1996). Hierbei wird der Abstand zweier aufeinanderfolgender Aktionspotentiale mit zunehmender Dauer des injizierten Strompulses länger. Beide Phänomene wirken einer erhöhten Exzitabilität neuronalen Gewebes entgegen. Im Kindling-Epilepsie Modell konnte eine transiente Verminderung der langsamen Nachhyperpolarisation nachgewiesen werden, welche zu einer erhöhten neuronalen Erregbarkeit führt (Behr et al., 2000).

## **1.10 Pathologische Plastizität in chronisch epileptischem Gewebe**

Die Temporallappenepilepsie (TLE) stellt mit einem Anteil von 70% die größte Gruppe innerhalb der fokalen Epilepsien dar. Ein Großteil der Anfälle lässt sich medikamentös gut kontrollieren. Bei Pharmakoresistenz kann den Patienten mit einer neurochirurgischen Intervention geholfen werden. Neuropathologisch findet sich in vielen Fällen ein mehr oder minder ausgeprägter neuronaler Zelluntergang innerhalb



der hippocampalen Formation. Je nach Ausprägung spricht man von einer Ammonshornsklerose (AHS) oder einer Non-Ammonshornsklerose (Non-AHS). Nach einer Einteilung nach Wyler (Wyler et al., 1992) unterscheidet man fünf neuropathologische Stadien, die sich nach dem Grad der Sklerose richten. Wyler Grad W0-W2 bezeichnet ein Non-AHS Gewebe, Wyler Grad W3, W4 ein AHS Gewebe (W0 – kein Zelluntergang bis W4 – Zelluntergang > 50% und Gliose in allen hippocampalen Arealen).

Die Rolle des Subikulums im Rahmen der TLE ist unklar. Es finden sich hier meist nur sehr gering ausgeprägte Zellverluste im Gegensatz zu den Areae CA1 und CA3. Aus dieser Tatsache könnte dem Subikulum eine Schlüsselfunktion zukommen, da die Generierung von Anfällen ein intaktes Netzwerk benötigt.

Bislang gibt es nur wenige elektrophysiologische Untersuchungen zur synaptischen Plastizität in epilepsiechirurgischen Resektaten von Patienten mit TLE. Im Gyrus dentatus von Patienten mit einer AHS zeigte sich eine verminderte LTP im Gegensatz zu Patienten mit einer extrahippokampalen Läsion (Beck *et al.*, 2000). Die Autoren folgerten daraus, dass bei einem primären epileptischen Fokus im Hippokampus kognitive Defizite mit einer verminderten synaptischen Plastizität einhergehen. In einer vorangehenden Arbeit konnten die Autoren zeigen, dass in der AHS Gruppe deutliche neuropsychologische Defizite bestehen. Bei einer extrahippokampalen Läsion und nur gering ausgeprägten neuropathologischen Veränderungen fanden sich hingegen nur geringe kognitive Defizite (Grunwald et al., 1998). Bestätigende Untersuchungen in Tiermodellen der TLE stehen bislang aus.

## **2. Fragestellung**

Folgende Fragestellungen sind Gegenstand dieser Arbeit:

1. Welche funktionelle Rolle spielen die unterschiedlichen Zelltypen im Subikulum der Ratte? Gibt es zellspezifische Unterschiede in Bezug auf die synaptische Plastizität? Welche Mechanismen spielen bei der LTP der unterschiedlichen Zelltypen eine Rolle?
2. Welche funktionellen Veränderungen des Subikulums lassen sich bei chronischer TLE nachweisen?
  - a. Intrinsische Eigenschaften: Wie verändern sich die Membraneigenschaften subikulärer Zellen im Rahmen der TLE?
  - b. Synaptische Eigenschaften: Welche Bedeutung haben die im Rahmen einer TLE häufig auftretenden Zelluntergänge in der Area CA1 auf die Neurotransmission im Subikulum? Wie verändern sich Kurz- und Langzeitplastizität?

Die Experimente wurden an kombinierten hippocampal-entorhinalen Hirnschnitten folgender Untersuchungsgruppen durchgeführt:

- A. Adulte Kontrollratten
- B. Adulte Pilocarpin-behandelte Ratten
- C. Patienten mit pharmakoresistenter TLE

### 3. *Material und Methoden*

#### 3.1 Präparation der Hirnschnitte der Ratte und verwendete Lösung

Adulte Ratten (6-8 Wochen, beiden Geschlechts) wurden mit Äther anästhesiert, die Gehirne entnommen und in 0-4° C kalter artifizierter zerebrospinaler Flüssigkeit (ACSF) überführt. Mit Hilfe eines Vibratoms (Campden Instruments Ltd.) wurden 400 µM dünne, horizontale Hirnschnitte bestehend aus Hippokampus, subikulärem Komplex, entorhinaler und perirhinaler Region sowie Teilen des temporalen Kortex (Abb. 1) angefertigt. Die Hirnschnitte wurden in eine Interface-Kammer überführt, welche mit begaster (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>), vorgewärmter (32-34° C) ACSF bei einem pH von 7,4 perfundiert wurde (in mM):

|                                 |      |
|---------------------------------|------|
| NaCl                            | 129  |
| Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 1,25 |
| NaHCO <sub>3</sub>              | 21   |
| KCl                             | 3    |
| CaCl <sub>2</sub>               | 1,6  |
| MgSO <sub>4</sub>               | 1,8  |
| Glucose                         | 10   |

Tabelle 1:      Artifizierter zerebrospinaler Flüssigkeit (ACSF)

#### 3.2 Messkammer

Die Abbildung 5 zeigt die Messkammer, die aus einer Perfusions- und einer Heizkammer besteht. Die Perfusionskammer wird mit einem speziellen Filterpapier ausgelegt, auf dem die Schnitte aufbewahrt werden. Die Perfusionsgeschwindigkeit beträgt ca. 1.5 ml/min. Die Heizkammer ist mit Aqua bidest gefüllt, erwärmt die zugeführte Lösung und leitet Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) an die Oberfläche der Hirnschnitte. Unter diesen Bedingungen bleiben die Hirnschnitte ca. 12 bis 14 h vital.

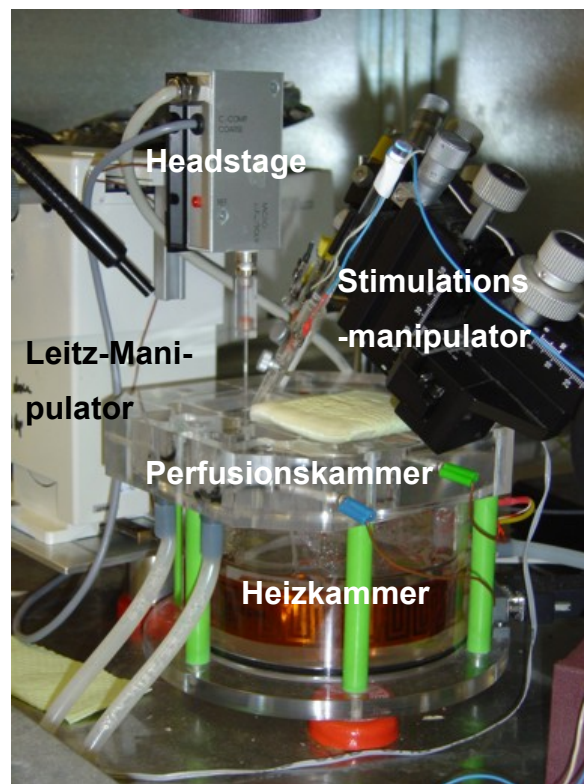


Abb. 5: Foto experimenteller Setup: Messkammer mit Perfusions- und Heizkammer. Ableitelektrode an Headstage und Leitz-Manipulator. Stimulationsmanipulator mit Reizelektrode.

### 3.3 Pilokarpin-Modell der Temporallappenepilepsie

Das Pilokarpin-Modell ist ein anerkanntes Modell der TLE. Die Behandlung von Ratten mit dem muskarinergen Agonisten Pilokarpin löst bei den Tieren einen Status epilepticus aus. In der vorliegenden Studie wurden adulte Ratten (150 – 230 g) mit Pilokarpin behandelt (intraperitoneale Applikation von 340 mg/kg KG). Nach wenigen Minuten zeigten die Tiere initiale Symptome einer Akinesie, orofaziale Automatismen und eines Kopftremors, und nachfolgend einen generalisierten tonisch-klonischen Anfall. Nach eineinhalb Stunden wurde der Anfall mit Diazepam (5 – 10 mg/kg KG) unterbrochen. Nach einer Latenzzeit („silent period“) von 4 bis 6 Wochen zeigten die Tiere spontan auftretende epileptische Anfälle (Cavalheiro, 1995). Um dies sicherzustellen, wurden die Tiere über 24 bis 48 Stunden videoüberwacht. Erst danach wurden die Gehirne der Tiere entnommen und die angefertigten Hirnschnitte elektrophysiologisch untersucht.

### **3.4 Epilepsiechirurgische Resektate von Patienten mit pharmakoresistenter Temporallappenepilepsie**

Die humanen Hirnschnittpräparate dieser Studie entstammen Patienten mit einer pharmakoresistenten Temporallappenepilepsie. Im Rahmen der prächirurgischen Diagnostik wurde eine Beteiligung des mesialen Temporallappens mittels Bildgebung und elektroenzephalografischer Diagnostik gesichert. Die Patienten wurden präoperativ über die Untersuchungen an dem entnommenen Gewebe aufgeklärt. Ein schriftliches Einverständnis der Patienten lag vor. Eine Übersicht über die biografischen Daten der Patienten findet sich in der Anlage. Alle Untersuchungen erfolgten gemäß den Richtlinien und der Zustimmung der hiesigen Ethikkommission.

Die Operationsresektate wurden nach dem Transport aus der neurochirurgischen Klinik der Charité in horizontale, 500 µm dünne Schnitte geschnitten und in einer Interface-Kammer aufbewahrt.

### **3.5 Elektrophysiologische Untersuchungen**

#### *3.5.1 Extrazelluläre Messungen*

Zur Aufzeichnung extrazellulärer Feldpotentiale wurden Glaspipetten von 1,5-2,0 mm Außendurchmesser verwendet. Die Elektroden wurden mit ACSF gefüllt und unter Sicht im Subikulum platziert. Nach Stimulation der alveären Afferenzen mittels einer bipolaren Stimulationselektrode konnte ein Populationsspike aufgezeichnet werden. Dieser spiegelt eine synchronisierte Entladung von mehreren hundert Nervenzellen dar. Als Verstärker wurde sowohl für die extra- wie für die intrazellulären Messungen ein SEC 5 LX- oder SEC 10 LX-Verstärker der Firma NPI Instruments verwendet.

#### *3.5.2 Intrazelluläre Messungen*

Die Untersuchung der intrinsischen und synaptischen Eigenschaften subikulärer Neurone erfolgte in der Strom- oder Spannungsklemme mit scharfer Mikroelektrode. Mit Hilfe eines Leitz-Manipulators (siehe Abbildung 5) wurde eine Mikroelektrode unter mikroskopischer Sicht im Subikulum platziert. Unter ständiger Applikation eines hyperpolarisierenden Strompulses (-0.1nA) wurde die Elektrode vorgetrieben und eine

Zelle unter Zuhilfenahme eines kurzen, oszillierenden Strompulses („buzz“) penetriert. Nach Stabilisierung des Ruhemembranpotentials wurde die Zellen auf ihre intrinsischen Eigenschaften untersucht. Es wurden insbesondere der Eingangswiderstand, das Entladungsverhalten sowie die Akkommodation der Zelle bestimmt. Während der Messung wurde eine Änderung des Eingangswiderstandes von bis zu 20 % des Ausgangswertes akzeptiert. In Analogie zu vorherigen Publikationen konnte zwischen beiden subikulären Zelltypen kein signifikanter Unterschied der passiven Membraneigenschaften festgestellt werden (Staff *et al.*, 2000; Taube, 1993).

### 3.5.3 Reizelektroden

Afferente Verbindungen subikulärer Pyramidenzellen wurden mit Hilfe einer bipolaren Mikrostimulationselektroden synaptisch aktiviert. Stimuliert wurde mit Einzel- und Doppelpulsen (50-100  $\mu$ s Dauer, 20-100 ms Interstimulusintervall).

### 3.5.4 Induktion einer Langzeitpotenzierung

Die Induktion einer LTP erfolgte mit vier hochfrequenten Stimulationen (100 Hz, Dauer 1 s) im Abstand von 10 s. Nachfolgend wurde über einen Zeitraum von > 15 min aufgezeichnet (alle 30 s ein Doppelpuls), um das Ausmaß der LTP nach tetanischer Stimulation beurteilen zu können. Die intrazelluläre Ableitungen wurden bei Ruhemembranpotential (Stromklemme/Brückenschaltung) in Gegenwart des GABA<sub>A</sub>-Rezeptor Antagonist Bicuculline (BCM) durchgeführt, um auszuschließen, dass die LTP durch eine Abnahme der GABA<sub>A</sub>-vermittelten Inhibition bedingt ist. Zur Verminderung polysynaptischer Antworten wurde die Magnesium- und Kalziumkonzentration auf 4 mM angehoben.

## 3.6 Pharmaka

Die folgende Tabelle fasst die verwendeten Pharmaka und deren Wirkung zusammen:

| Pharmaka  | Funktion   | Konzentration  |
|---|--|----------------|
| <i>D,L</i> -2-Amino-5-phosphono-valeric acid ( <i>D,L</i> -APV)           | NMDA-Rezeptor Antagonist   | 60-200 $\mu$ M |
| 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid (BAPTA) | Kalziumchelator  | 200 mM         |
| Bicuculline (BCM)   | GABA <sub>A</sub> -Rezeptor Antagonist   | 5 $\mu$ M      |
| Cäsiumchlorid   | Blockade des H-Stroms, sowie verschiedener Kaliumkanäle z.B. des K <sub>IR</sub> | 3 mM           |
| 1,9-Dideoxyforskolin  | Inaktives Analogon von Forskolin   | 50 $\mu$ M     |
| Forskolin   | Zellpermeabler Aktivator von cAMP  | 50 $\mu$ M     |
| Ifenprodil  | Antagonist der NMDAR-2B Untereinheit   | 10 $\mu$ M     |
| Kynurensäure  | Glutamatrezeptor-Antagonist  | 5-10 mM        |
| N <sub>ω</sub> -Nitro-L-Arginine  | Inhibitor der NO-Synthetase  | 50 $\mu$ M     |
| <i>RS</i> - $\alpha$ -methyl-4-carboxy-phenylglycine ( <i>RS</i> -MCPG)   | Antagonist der metabotropen Glutamatrezeptoren der Gruppe I und II               | 500 $\mu$ M    |
| Verapamil   | Antagonist des L-Typ Kalziumkanals   | 50-100 $\mu$ M |

Tabelle 2: Verwendete Pharmaka

### 3.7 Erfassung und Auswertung der Daten

Für die Erfassung der Daten wurde das Programm TIDA (Heka, Lambrecht) verwendet. Alle Daten wurde online auf einem Oszillografen gesichtet. Nach Aufnahme von stabilen Kontrollwerten über einen Zeitraum von 10- bis 20 Minuten, einer sogenannten Baseline, erfolgte das LTP-Protokoll und die anschließende off-line Auswertung der LTP.

Der Doppelpulsindex wurde als Amplitude des zweiten EPSP (bzw. des Populationsspike) dividiert durch die Amplitude des ersten EPSP berechnet.

Neben dem Doppelpulsindex stellt die Analyse des Variationskoeffizienten (CV) eine statistische Methode zur Beschreibung eines präsynaptischen Effektes dar. Der CV ist lediglich abhängig von zwei präsynaptischen Parametern: der Anzahl der Freisetzungsstellen ( $n$ ) und der Freisetzungswahrscheinlichkeit ( $p$ ) von Transmittermolekülen. Er berechnet sich als  $CV = [(1 - p)/np]^{-1/2}$  (Manabe *et al.*, 1993; Voronin, 1993).

Im Rahmen elektrophysiologischer Untersuchungen zur synaptischen Plastizität wird meist der Term  $CV^{-2}$  verwendet (Bekkers & Stevens, 1990; Malinow & Tsien, 1990; Manabe *et al.*, 1993). Er berechnet sich als  $CV^{-2} = (\text{Mittelwert})^2 / (\text{Standardabweichung})^2$ .

Das arithmetische Mittel ist als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. Statische Tests wurden mit Hilfe von Excel (Microsoft) durchgeführt. Es wurde in der Regel, wenn nicht gesondert erwähnt, ein Student's  $t$ -test durchgeführt. Für die erhobenen Daten wurde eine Normalverteilung angenommen. Das Signifikanz-Niveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt. Ein  $p < 0,01$  wurde als „hoch signifikant“ definiert, ein  $p < 0,001$  als „höchst signifikant“.



## 4. Ergebnisse

### 4.1 Extrazelluläre Ableitungen zur Langzeitpotenzierung im Subikulum der Ratte

Stimulation der Axone von Pyramidalzellen der Area CA1 im Alveus führte bei extrazellulärer Ableitung im Subikulum zu einem Populationsspike. Ein typisches Beispiel ist in der Abbildung 6A zu sehen. Die multiplen Populationsspikes sind auf die synchronisierten Entladungen von Bursterzellen zurückzuführen (Stewart, 1997). Die maximale Größe der abgeleiteten Feldpotentiale betrug in der Regel 1,5-2 mV.

Für die Untersuchung der synaptischen Plastizität wurde eine Feldpotentialgröße von 30-50% des Maximalwertes gewählt. Nach Aufzeichnung einer Baseline über einen Zeitraum von 20 Minuten wurden subikuläre Neurone tetanisch stimuliert. In der Abbildung 6A sieht man, dass es nach dem Tetanus zu einer Vergrößerung des Populationsspike gekommen ist. Der Populationsspike direkt nach dem Tetanus zeigt die posttetanische Potenzierung (PTP) an. Im Verlauf der Messung nimmt die PTP ab und geht in eine stabile LTP über, welche unter *in vitro* Bedingungen mehrere Stunden anhält (Abraham & Williams, 2003).

In den extrazellulären Ableitungen konnte eine stabile Potenzierung über mindestens 50 bis 60 Minuten aufgezeichnet werden. Die GABAerge Transmission wurde in den extrazellulären Ableitungen nicht geblockt. Die PTP betrug  $165 \pm 8\%$  der Kontrollamplitude ( $p < 0,01$ ), die LTP 30 Minuten nach tetanischer Reizung  $129 \pm 7\%$  und 50 Minuten danach  $124 \pm 3\%$  (Abbildung 6B,  $n = 5$ ,  $p < 0,05$ ).

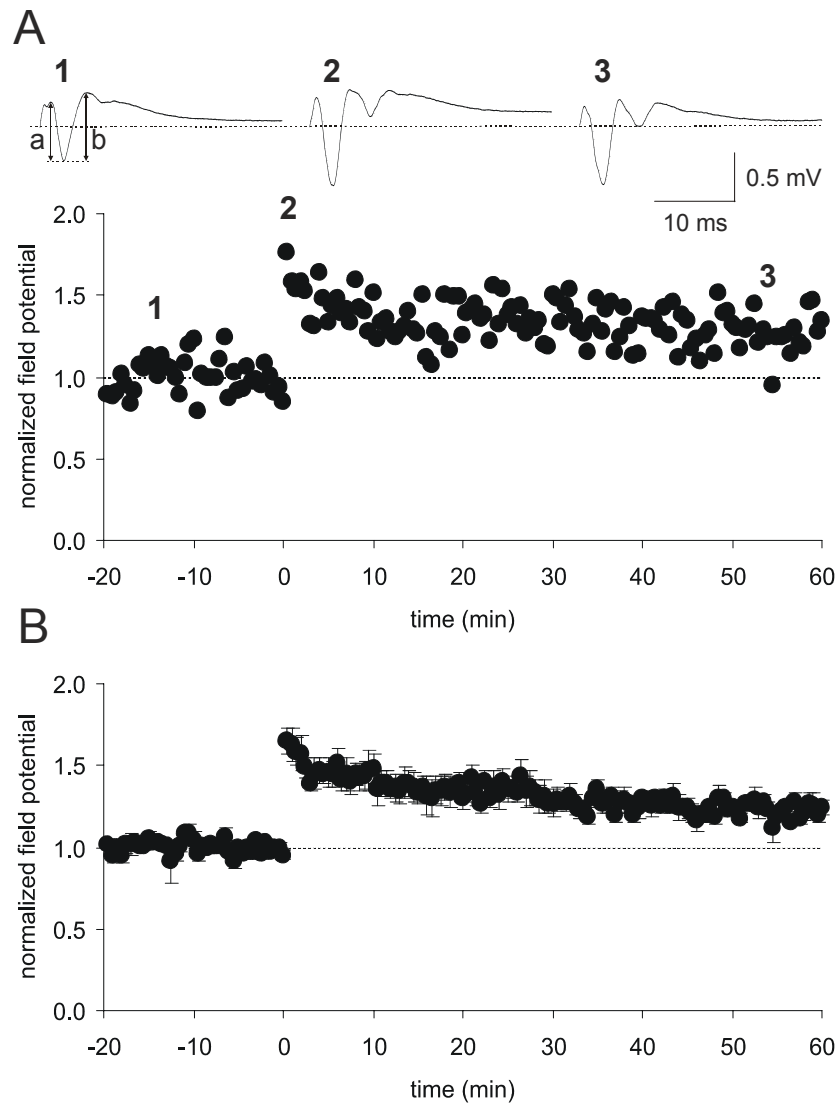


Abb. 6: Extrazelluläre Ableitungen: (A): ein typisches Beispiel eines Populationsspike nach alveärer Reizung. 1: Baseline-Antwort, 2: Posttetanische Potenzierung, 3: LTP. Die Amplitude des Populationsspike wurde berechnet als  $(a+b)/2$ . (B): Zeitverlauf der extrazellulären Antworten ( $n = 5$ ).

## 4.2 Zellspezifische Langzeitpotenzierung im Subikulum der Ratte

### 4.2.1 Synaptische Langzeitpotenzierung unter Kontrollbedingungen

Tetanische Stimulation erzeugte sowohl in regulär feuernenden als auch in Bursterzellen eine PTP und eine LTP (30 Minuten nach Tetanus). Während der intrazellulären Ableitungen wurde die schnelle GABAerge Neurotransmission mit dem GABA<sub>A</sub>-Rezeptor Antagonisten Bicuculline (5  $\mu$ M, BCM) blockiert, um auszuschließen, dass eine LTP nicht durch eine Abnahme der GABA<sub>A</sub>-vermittelten Inhibition bedingt ist.

Bursterzellen zeigten eine PTP von  $521 \pm 80$  % der Kontrollamplitude ( $p < 0,01$  verglichen mit Werten vor der tetanischen Reizung) und eine LTP von  $282 \pm 30$  % der Kontrollamplitude ( $n = 6$ ,  $p < 0,01$ ). In regulär feuernenden Zellen fand sich eine PTP von  $228 \pm 29$  % ( $p < 0,05$ ) und eine LTP von  $166 \pm 26$  % der Kontrollamplitude ( $p < 0,05$ ,  $n = 5$ , Abbildung 7).

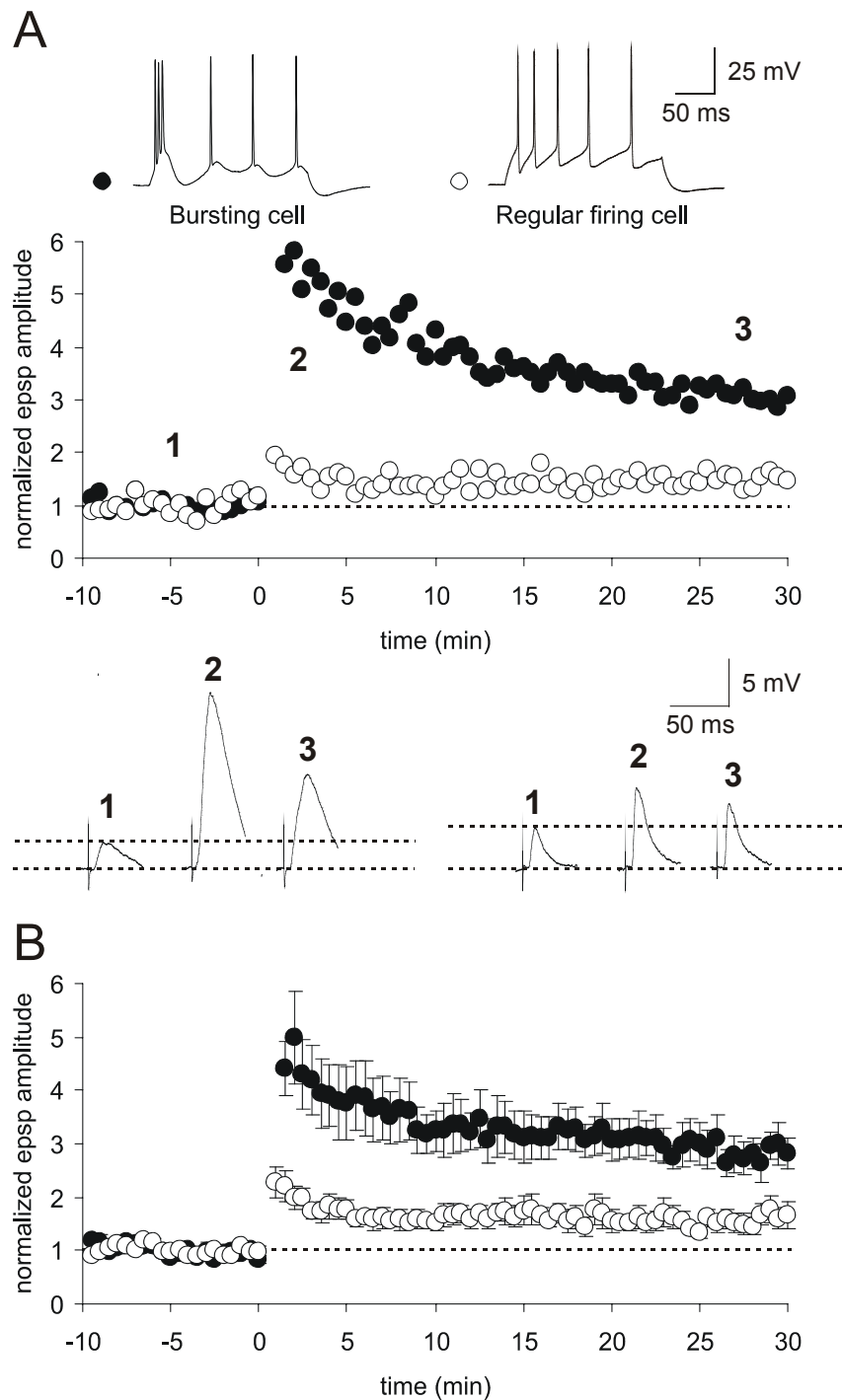


Abb. 7: Zellspezifische LTP. Beispiele für die unterschiedlichen Zelltypen. (A): typische Beispiele der zellspezifischen LTP, gefüllte Punkte: Bursterzellen (n = 6), offene Punkte: regulär feuernde Zellen (n = 5). 1: Baseline-Antwort, 2: PTP, 3: LTP. (B): zusammengefasste Zeitverläufe für beide Zelltypen.

Bursterzellen zeigten eine signifikant erhöhte PTP ( $p < 0,05$ ) und LTP ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zu regulär feuernenden Zellen. In Abbildung 8 sind die Ergebnisse als Balkendiagramm für beide Zelltypen zusammengefasst.

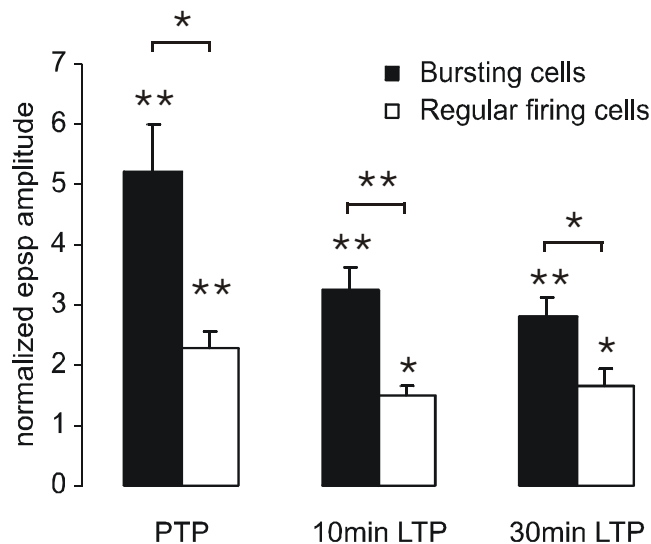


Abb. 8: Zusammenfassung der LTP in Burster-, sowie regulär feuernenden Zellen. Bursterzellen zeigten eine signifikant erhöhte PTP und LTP im Vergleich zu regulär feuernenden Zellen. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ .

Bursts von Aktionspotentialen während des Stimulationsprotokolls könnten zu einen vermehrten Einstrom von Kalziumionen in die Zelle führen und so eine vergrößerte LTP bedingen. Während des Stimulationsprotokolls wurde deshalb darauf geachtet, dass die Neurone keine Aktionspotentiale feuerten (Abbildung 9). Lediglich in einer Bursterzelle wurde ein Burst von Aktionspotentialen während des Tetanus aufgezeichnet. Eine vergrößerte LTP Amplitude, sowie ein veränderter Zeitverlauf konnte aber nicht registriert werden.

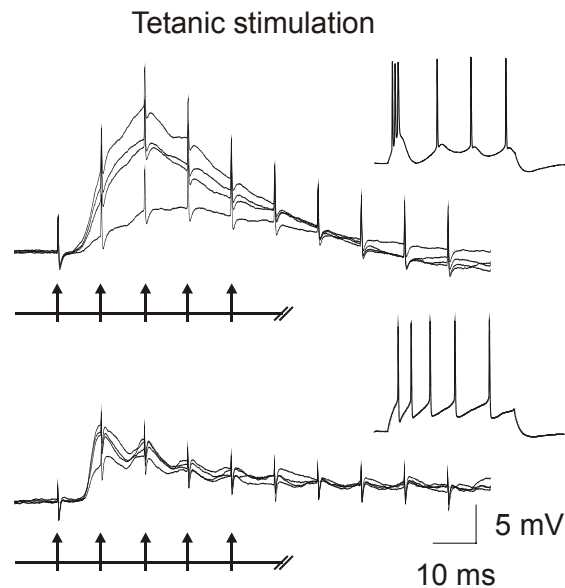


Abb. 9: EPSPs während eines Tetanus. Keine der beiden Zelltypen feuerte ein Aktionspotential während des Tetanus (Darstellung der ersten 10 Pulse). Die Zeitverläufe der Potenzierung zeigen ein typischen Abfall der EPSPs nach wenigen Pulsen.

#### 4.2.2 APV-sensitive Langzeitpotenzierung in regulär feuernenden Zellen

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist die LTP in den meisten bislang untersuchten Hirnregionen NMDAR-abhängig. (Ausnahmen siehe Einleitung). Bei Applikation des NMDAR-Antagonisten *D,L*-APV (im weiteren bezeichnet als APV) in einer gängigen Konzentration von 60  $\mu\text{M}$  (Zalutsky & Nicoll, 1990)<sup>1</sup> konnte die Induktion der LTP in regulär feuernenden Zellen allerdings nicht unterdrücken. In Anwesenheit von APV (60  $\mu\text{M}$ ) betrug die PTP  $246 \pm 34 \%$  und die LTP  $150 \pm 14 \%$  der Kontrollamplitude ( $p < 0,01$ ,  $n = 6$ , Abbildung 10 und 11A).

<sup>1</sup> Die von Zalutsky und Nicoll (1990) verwendeten Konzentrationen von 25  $\mu\text{M}$  *D*-APV oder 50  $\mu\text{M}$  *D,L*-APV blockierten die LTP an kommissuralen Fasern der Area CA3.

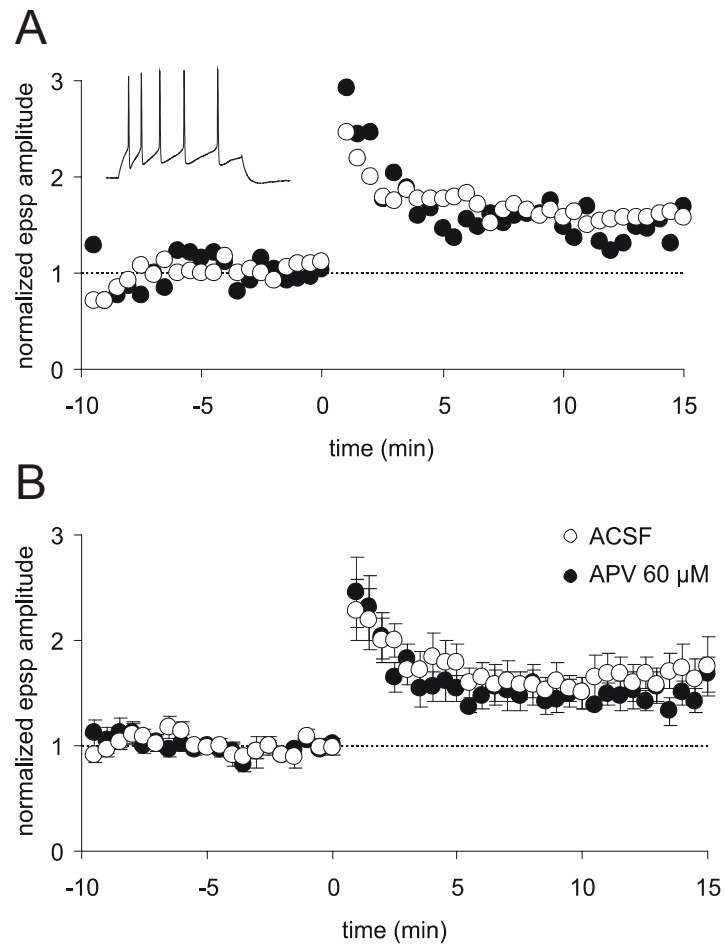


Abb. 10: Effekt von APV 60  $\mu$ M auf die LTP in regulär feuernenden Zellen. (A): APV 60  $\mu$ M hatte keinen Effekt auf die LTP-Amplitude. Ein typisches Beispiel für den Zeitverlauf. Offene Punkte: ACSF, geschlossene Punkte: APV 60  $\mu$ M (B): Zeitverlauf für n = 6 regulär feuernende Zellen.

In der Literatur werden zur Blockade NMDA-vermittelter synaptischer Antworten auch höhere Konzentrationen an APV verwendet (Mellor & Nicoll, 2001; Schmitz *et al.*, 2003). So konnte unter 200  $\mu$ M APV die LTP in den regulär feuernenden Zellen blockiert werden.

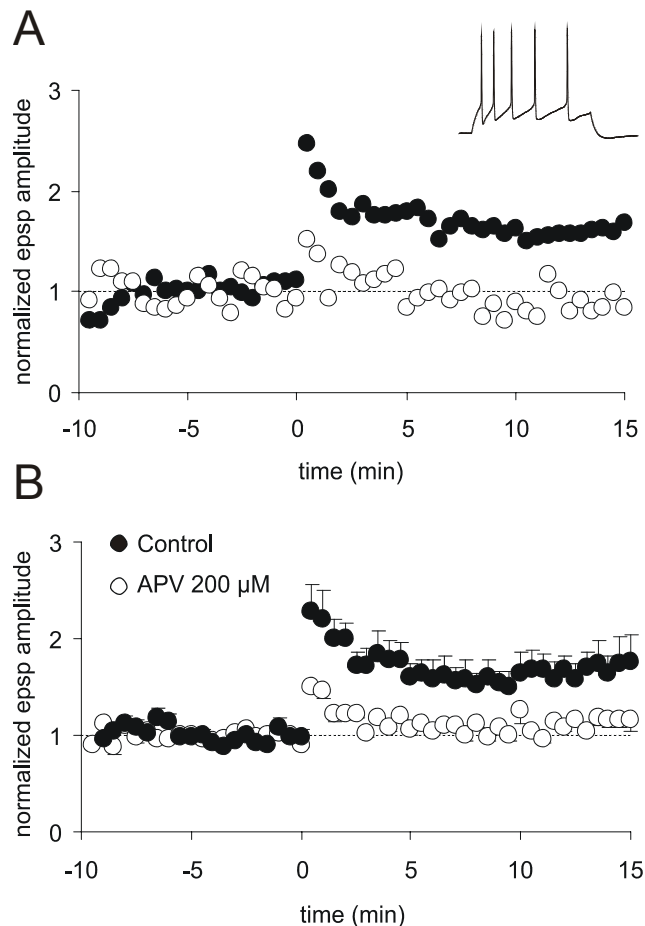


Abb. 11: APV 200 µM blockierte die LTP in regulär feuernenden Zellen. (A): Beispielizele. (B): Zeitverlauf für  $n = 4$ .

In Abbildung 11 sind die Ergebnisse für vier Zellen zusammengefasst. Zehn Minuten nach dem Tetanus war der posttetanische Anstieg der EPSP Amplituden bereits wieder auf  $101 \pm 6 \%$  der Kontrollamplitude abgefallen.

Wie bereits in Kapitel 1.4 beschrieben, erlaubt der Doppelpulsindex Rückschlüsse auf den Expressionsort der LTP. Eine Änderung des Doppelpulsindex nach tetanischer Reizung weist auf eine präsynaptische Expression der LTP hin (Debanne *et al.*, 1996). In den regulär feuernenden Zellen konnte keine signifikante Änderung des Doppelpulsindex festgestellt werden. Vor tetanischer Reizung betrug der Doppelpulsindex  $1,30 \pm 0,13$ , danach  $1,17 \pm 0,13$  ( $n = 6$ ,  $p = 0,47$ , Abbildung 12).

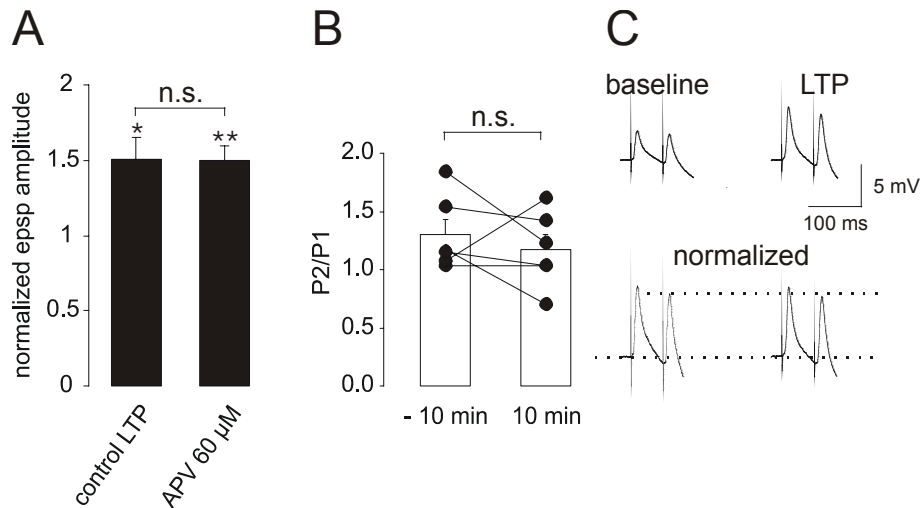


Abb. 12: Doppelpulsindex in regulär feuernenden Zellen. (A): Zusammenfassendes Balkendiagramm. n.s.: nicht signifikant. (B): Doppelpulsindex vor und nach dem Tetanus zeigte keine signifikante Veränderung (in Gegenwart von APV 60  $\mu$ M). (C): Typische EPSPs vor und nach LTP-Induktion, sowie normalisierte Doppelpulsantworten.

Die Berechnung des Variationskoeffizienten (CV, bzw.  $CV^{-2}$ , siehe Material und Methoden) stellt neben dem Doppelpulsindex eine weitere Methode dar, indirekt eine Veränderung der präsynaptischen Transmitterfreisetzung nachzuweisen (Faber & Korn, 1991). Bei Wahl eines fünfminütigen Intervalls zur Bestimmung des  $CV^{-2}$  ergab sich ein heterogenes Bild. Vergleicht man das Intervall von „minus 5 bis 0“ Minuten vor LTP Induktion (mittlerer  $CV^{-2}$  mit  $65,6 \pm 10,0$ , Abbildung) mit dem Intervall „5 bis 10“ Minuten nach Hochfrequenzstimulation (mittlerer  $CV^{-2}$  mit  $103,3 \pm 26,6$ ), so konnte keine statistisch signifikante Veränderung des  $CV^{-2}$  festgestellt werden ( $p = 0,23$ ,  $n = 6$ ). Zwischen dem Intervall von „minus 10 bis minus 5“ Minuten vor LTP Induktion und dem Intervall „10 bis 15“ Minuten nach tetanischer Reizung (mittlerer  $CV^{-2}$  mit  $108,5 \pm 32,7$ ) zeigte sich allerdings ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,03$ ). Somit muss man an dieser Stelle feststellen, dass sich aus diesen Daten kein definitiver Schluss über den Ort der LTP Expression ziehen lässt.

Interessanterweise konnten Manabe und Kollegen nach Induktion einer LTP in der Area CA1 ebenfalls keine Veränderung des Doppelpulsindex, wohl aber eine Zunahme des Variationskoeffizienten feststellen. Die Gründe hierfür sind bis dato unklar (Manabe *et al.*, 1993).



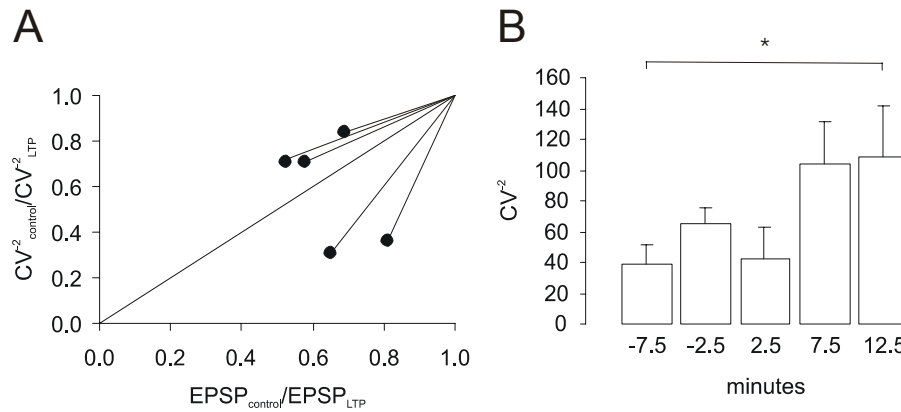


Abb. 13: Variationskoeffizient in regulär feuernenden Zellen. (A): Datenpunkte entlang der Winkelhalbierenden deuten auf präsynaptische Veränderung nach tetanischer Reizung hin. (B): Zeitverlauf  $CV^2$ . Daten auf x-Achse: Mittelwerte der entsprechenden Zeitdauer in Minuten ( $n = 6$ ).

#### 4.2.3 APV-insensitive Langzeitpotenzierung in Bursterzellen

Im Gegensatz zu den regulär feuernenden Zellen konnte die Verwendung von APV in den Konzentrationen von 60 und 200  $\mu M$  die LTP in den Bursterzellen nicht vollständig blockieren. 60  $\mu M$  APV reduzierte die Amplitude der LTP um ungefähr 100 % von 300 auf 200 % der Kontrollamplitude ( $207 \pm 11$  %,  $p < 0,05$ ,  $n = 5$ , Abbildung 14). Eine Erhöhung der Konzentration von 60 auf 200  $\mu M$  ergab eine weitere Reduktion um 50 % auf  $145 \pm 10$  % der Amplitude ( $n = 5$ ,  $p < 0,05$ , Abbildung 15).

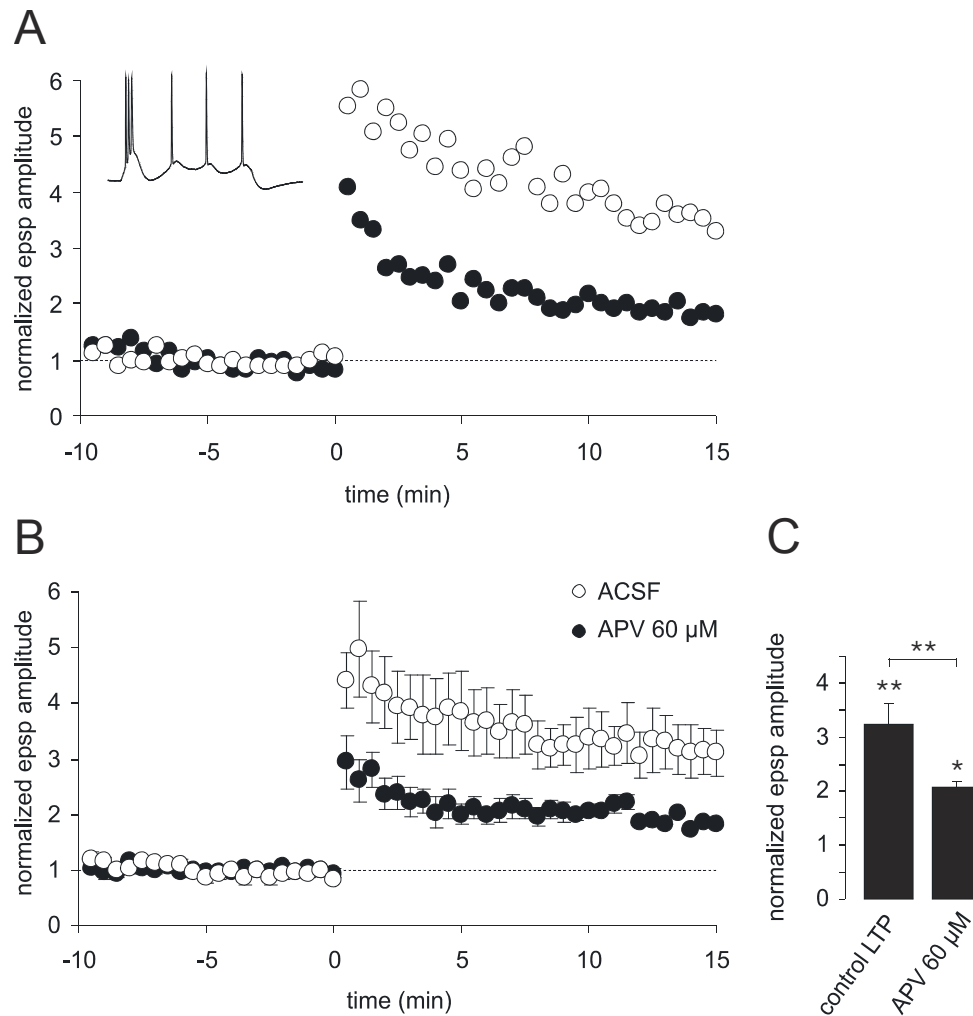


Abb. 14: Effekt von APV 60  $\mu$ M auf die LTP in Bursterzellen. (A): APV 60  $\mu$ M reduzierte die Amplitude um ungefähr 100 % von 300 auf 200 %. Ein typisches Beispiel einer Bursterzelle. (B): Zeitverlauf für n = 5 Bursterzellen. (C): Zusammenfassendes Balkendiagramm. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ .

Somit zeigte sich in Bursterzellen im Gegensatz zu regulär feuernenden Zellen eine signifikante Reduktion der LTP in Gegenwart von 60  $\mu$ M APV sowie eine residuale Komponente nach Badapplikation der erhöhten APV Konzentration von 200  $\mu$ M.

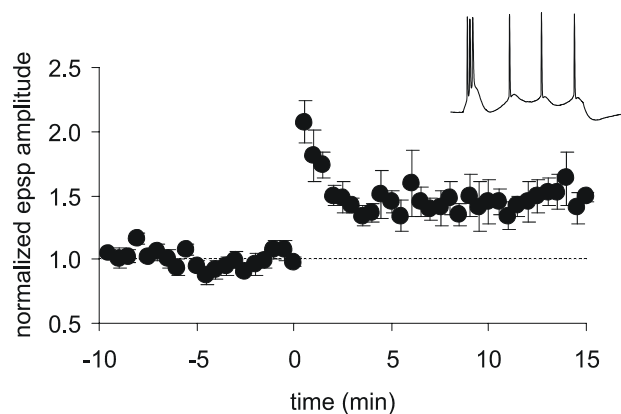


Abb. 15: Effekt von 200  $\mu$ M APV auf die LTP in Bursterzellen ( $n = 5$ ).

Die Auswertung des Doppelpulsindex in Bursterzelle zeigte eine hochsignifikante Veränderung nach Tetanisierung. So änderte sich der Doppelpulsindex von  $1,47 \pm 0,15$  zu  $1,08 \pm 0,10$  ( $n = 5$ , 60  $\mu$ M APV,  $p < 0.01$ , Abbildung 16 A).

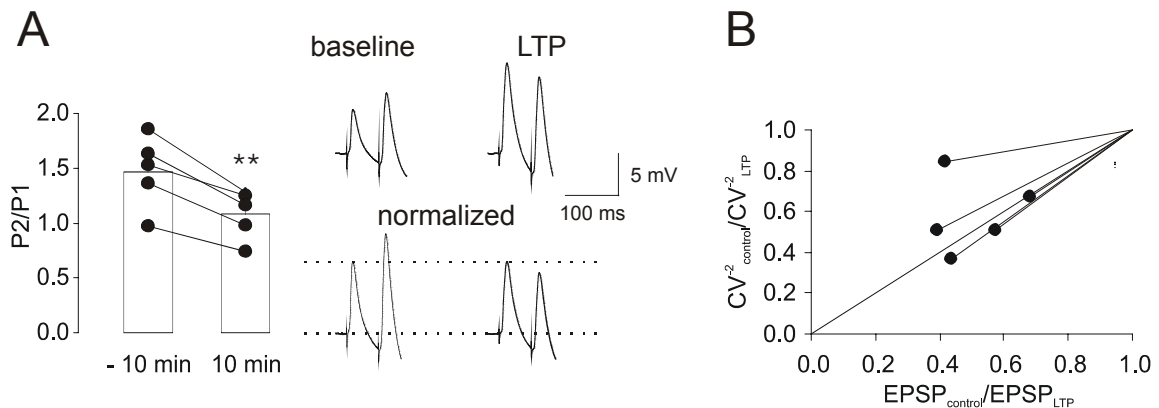


Abb. 16: Doppelpulsindex und Variationskoeffizient in Bursterzellen. (A): Änderung des Doppelpulsindexes. Typische EPSPs vor und nach LTP-Induktion sowie normalisierte Doppelpulsantworten. (B): Variationskoeffizient. Datenpunkte entlang der Winkelhalbierenden deuten auf präsynaptische Veränderung nach tetanischer Reizung hin ( $n = 5$ ).

Auch die Veränderung des Variationskoeffizienten in den Bursterzellen weist auf eine präsynaptische Expression hin. So liegen die errechneten Datenpunkte entlang der Winkelhalbierenden (Abbildung 16B).

#### 4.2.4 Einfluss des Kalziumchelators BAPTA auf die LTP in Bursterzellen und regulär feuernenden Zellen

Der Doppelpulsindex sowie die Veränderungen des Variationskoeffizienten geben eindeutige Hinweise auf eine präsynaptische Komponente der LTP in den Bursterzellen. Um zu belegen, dass die LTP in Bursterzellen tatsächlich unabhängig von dem postsynaptischen Einstrom von Kalzium ist, wurden vier Bursterzellen mit je 200 mM BAPTA dialysiert. Nach einer Dialysedauer von einer halben Stunde ( $n = 2$ ) bis zu einer Stunde ( $n = 2$ ) konnte noch eine LTP ausgelöst werden. Abbildung 17 zeigt ein Beispiel. Dies zeigt, dass ein Teil der LTP in Bursterzellen unabhängig ist von dem postsynaptischen Einstrom von Kalzium. Sie wird somit präsynaptisch induziert und exprimiert.

In den regulär feuernenden Zellen zeigten der Doppelpulsindex und die Veränderungen des Variationskoeffizienten widersprüchliche Ergebnisse. In Analogie zu den Bursterzellen wurden drei regulär feuernende Zellen mit 200 mM BAPTA dialysiert. Nach einer Dialysedauer von einer halben Stunde konnte in den regulär feuernenden Zellen im Gegensatz zu den Bursterzellen keine LTP mehr ausgelöst werden ( $n = 3$ , Abbildung 17). Diese Ergebnisse zeigen, dass die LTP in den regulär feuernenden Zellen postsynaptisch induziert wird.

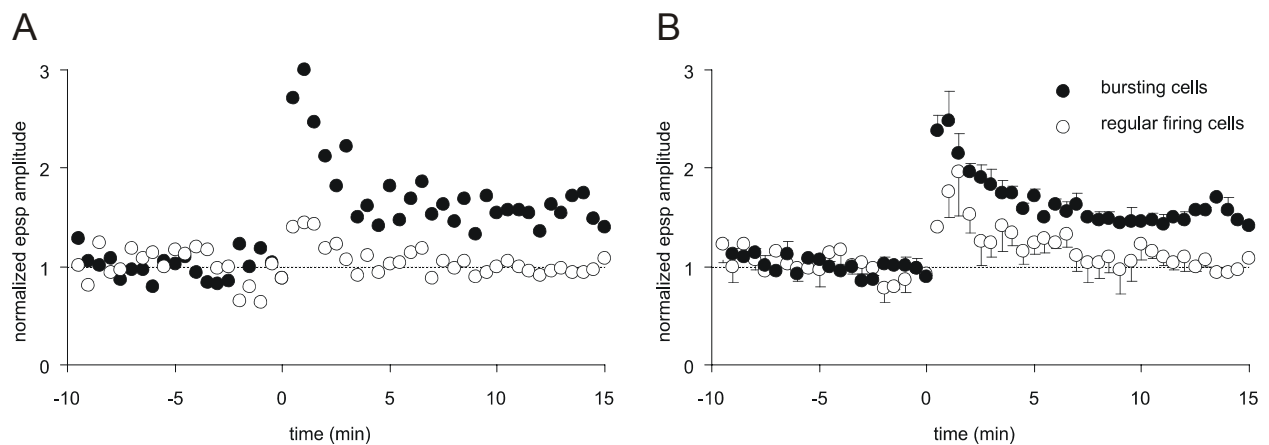


Abb. 17: Einfluss des Kalziumchelators BAPTA (200 mM) auf LTP in Bursterzellen und regulär feuernenden Zellen. (A): Beispielzellen. Eine halbe Stunde Dialysedauer. (B): Zusammenfassende Zeitverläufe für regulär feuernende Zellen ( $n = 3$ ) und Bursterzellen ( $n = 4$ ).

#### 4.2.5 Applikation des Glutamatantagonisten Kynurensäure

Um neben dem veränderten Doppelpulsindex, dem  $CV^2$ -Index sowie den BAPTA-Experimenten einen weiteren Beleg für eine präsynaptische Expression der LTP in den Bursterzellen zu bekommen, wurde im nächsten Schritt das LTP-Protokoll in Gegenwart des Glutamatrezeptorantagonist Kynurensäure durchgeführt. Die Applikation von Kynurensäure blockiert alle ionotropen Glutamatrezeptoren, dass heißt sowohl AMPA-, NMDA- als auch Kainatrezeptoren. Somit ist der Kalziumeinstrom durch NMDAR in die postsynaptische Zelle blockiert. Zusätzlich wird der Kalziumeinstrom über spannungsabhängige Kalziumkanäle blockiert, da die postsynaptische Zelle in Anwesenheit von Kynurensäure nicht ausreichend depolarisiert werden kann. Veränderungen, die eine erhöhte Kalziumkonzentration in der Postsynapse benötigen, z.B. der Einbau von zusätzlichen AMPAR in die postsynaptische Membran, sind somit nicht mehr möglich (siehe Einleitung). Die Transmitterfreisetzung aus der

präsynaptischen Endigung erfolgt aufgrund eines Kalziumeinstromes durch evozierte Aktionspotentiale und Aktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle. Sie wird durch die Applikation von Kynurensäure nicht beeinträchtigt. Die Induktion einer präsynaptischen, NMDAR-unabhängigen LTP in Bursterzellen, die auf einer erhöhten Transmitterfreisetzung beruhen könnte, müsste aufgrund dieser Überlegungen unter Applikation von Kynurensäure nicht beeinträchtigt sein.

Nach kurzer 5 bis 10 minütiger Applikation von Kynurensäure wurde die synaptische Transmission komplett blockiert. Zum Zeitpunkt Null konnte keine postsynaptische Antwort mehr aufgezeichnet werden. Der subikuläre Eingang wurde tetanisch gereizt und die Kynurensäure wieder ausgewaschen. Die Auswaschzeit betrug in der Regel 30 bis 45 Minuten. Wider Erwarten konnte nach Auswaschen des Glutamaterezeptorantagonisten keine Potenzierung der EPSP Amplitude festgestellt werden (50 Minuten nach Tetanus  $106 \pm 3 \%$ ,  $n = 5$ , Abbildung 17).

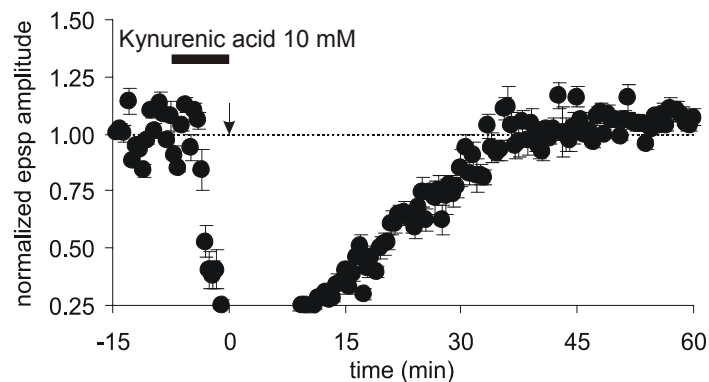


Abb. 18: Applikation des Glutamaterezeptor Antagonisten Kynurensäure. Nach Auswaschen der Droge zeigte sich keine Zunahme der EPSP Amplitude ( $n = 5$ ). Der Pfeil markiert den Zeitpunkt des Tetanus.

#### 4.2.6 NR2B-abhängige Potenzierung in Bursterzellen

Aufgrund der verschiedenen Hinweise auf eine präsynaptische Form der LTP legt die fehlende Potenzierung nach Auswaschen von Kynurensäure den Schluss nahe, dass Glutamaterezeptoren einen Beitrag zur präsynaptischen LTP in Bursterzellen leisten könnten. Die konzentrationsabhängige Wirkung von APV deutet auf eine Beteiligung verschiedener Untereinheiten des NMDAR hin. Es ist bekannt, dass APV eine geringere Affinität zu NR2B- als zu NR2A-Untereinheiten hat (Buller & Monaghan, 1997; Hrabetova *et al.*, 2000; Laurie & Seeburg, 1994). Um dies zu überprüfen, wurde

der selektive NR2B-Antagonist Ifenprodil eingesetzt (Williams, 1993). In der Tat blockierte Ifenprodil zusammen mit APV in der Konzentration von 60  $\mu\text{M}$  die Induktion einer LTP in Bursterzellen (Abbildung 19A). Nach Auswaschen von APV und Ifenprodil war eine 200 %-ige Potenzierung auslösbar. Eine Zusammenfassung der Daten ist in Abbildung 19B zu sehen ( $110 \pm 5 \%$ ,  $n = 4$ ,  $p = 0,18$ ).

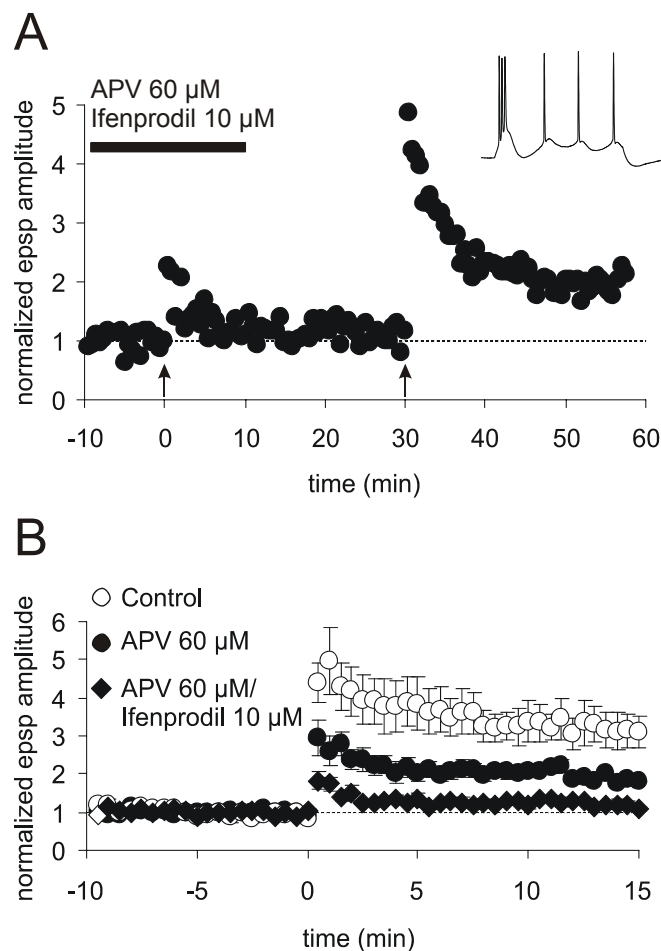


Abb. 19: NR2B-abhängige LTP in Bursterzellen. (A): APV 60  $\mu\text{M}$  und Ifenprodil 10  $\mu\text{M}$  blockierten die LTP in Bursterzellen. Nach Auswaschen konnte eine zweihundertprozentige Potenzierung registriert werden. (B): Zusammenfassende Zeitverläufe.

Die alleinige Applikation von Ifenprodil unterdrückte die LTP zu  $192 \pm 27 \%$  ( $n = 4$ , Abbildung 20), konnte sie aber nicht vollständig aufheben. Der Doppelpuls änderte sich nach Applikation von Ifenprodil nicht signifikant von  $1,37 \pm 0,13$  zu  $1,28 \pm 0,15$  (15 Minuten nach Tetanus,  $p > 0,05$ ). Dies weist darauf hin, dass die Ifenprodil-insensitive LTP postsynaptisch exprimiert wird. Umgekehrt lässt sich schlussfolgern, dass die

Ifenprodil-sensitive LTP der präsynaptischen LTP in den Bursterzellen entspricht. In regulär feuernenden Zellen konnte Ifenprodil die LTP nicht blockieren ( $145 \pm 22 \%$ ,  $n = 3$ ).

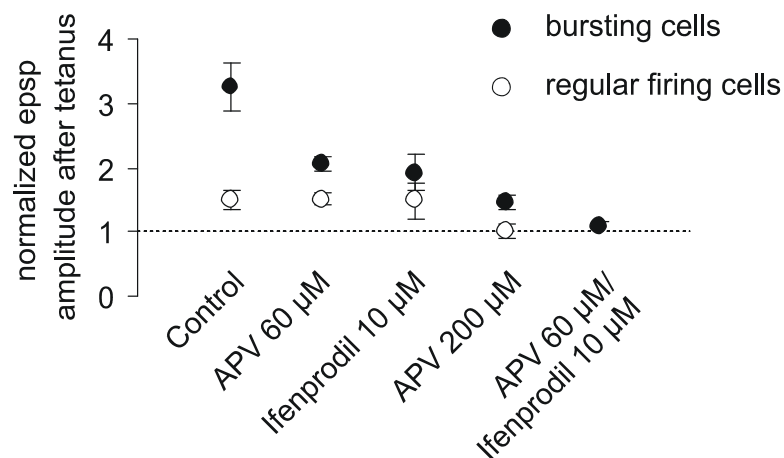


Abb. 20: Zusammenfassendes Diagramm für Bursterzellen und regulär feuernende Zellen.

#### 4.2.7 Rolle metabotroper Glutamatrezeptoren in subikulärer LTP

Da es eine Vielzahl von Hinweisen auf eine Beteiligung von metabotropen Glutamatrezeptoren im Rahmen synaptischer Plastizitätsphänomene gibt, wurde in den folgenden Experimenten die Rolle metabotroper Glutamatrezeptoren untersucht (Riedel & Reymann, 1996; Yeckel *et al.*, 1999). (RS) – MCPG blockiert die metabotropen Glutamatrezeptoren der Gruppe I und II. Wie in Abbildung 21 zu sehen ist, konnte (RS) – MCPG die Induktion sowohl in den Bursterzellen, als auch in den regulär feuernenden Zellen nicht unterbinden. Nach einer Zeit von 15 Minuten betrug auch hier die Potenzierung ungefähr 300 %. In der abgebildeten regulär feuernenden Zelle fand man nach 15 Minuten eine einhundertfünfzigfache Potenzierung. Diese Werte sind sehr gut vergleichbar mit den Kontrolldaten.

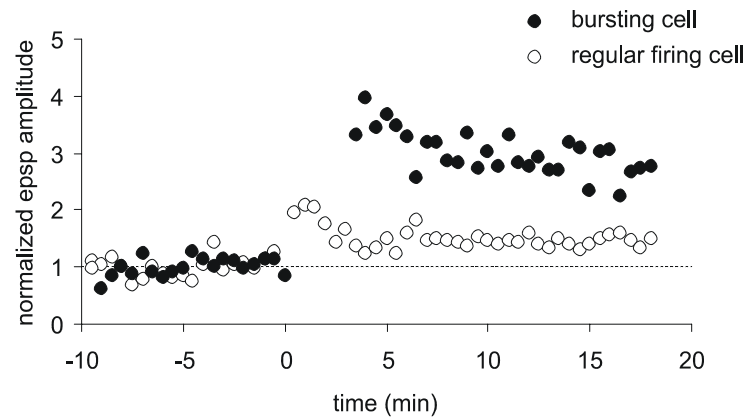


Abb. 21: Einfluss von metabotropen Glutamatrezeptoren auf die subikuläre Langzeitpotenzierung. Offene Punkte: Regulär feuernende Zellen, geschlossene Punkte: Bursterzellen. Die PTP in der Bursterzelle war so massiv, so dass aufgrund der hier gewählten graphischen Darstellung die ersten Werte nicht dargestellt wurden.

#### 4.2.8 Rolle von L-Typ Kalzium Kanälen in subikulärer LTP

Untersuchungen zur synaptischen Plastizität in der Area CA1 konnten zeigen, dass L-Typ Kalzium Kanäle neben NMDAR an der Induktion der LTP beteiligt sind (Golding *et al.*, 2002). Der Beitrag dieser Kanäle zur LTP in regulär feuernenden Zellen wurde mit dem Antagonisten Verapamil (50 – 100  $\mu$ M) untersucht. 15 Minuten nach Tetanisierung zeigte sich kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollwerten. Die normalisierte EPSP-Amplitude betrug  $1,57 \pm 0,23$  ( $n = 4$ , Abbildung 22).

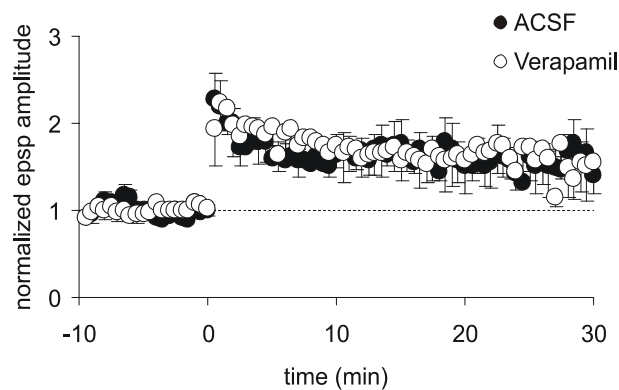


Abb. 22: Einfluss L-Typ Kalzium Kanäle auf LTP in regulär feuernenden Zellen. Es zeigte sich nach Applikation von Verapamil kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen.



#### 4.2.9 Rolle von Stickstoffmonoxid in subikulärer LTP

Als membranpermeables Molekül spielt Stickstoffmonoxid (NO) in der retrograden Signalübertragung zwischen Nervenzellen eine wichtige Rolle (O'Dell *et al.*, 1991). NO wird kalziumabhängig postsynaptisch gebildet und diffundiert in die Präsynapse. Greene und Kollegen konnten zeigen, dass regulär feuernde Zellen selektiv das Enzym Stickstoffmonoxidsynthetase (NOS) exprimieren (Greene *et al.*, 1997). Es ist somit denkbar, dass NO an der Expression der LTP in regulär feuernden Zellen beteiligt ist. Ein Kalziumeinsturm durch den NMDAR würde selektiv in den regulär feuernden Zellen die NOS aktivieren und die Bildung von NO anregen.

Zur Unterdrückung der NOS Aktivität wurden die Hirnschnitte mit dem NOS-Inhibitor  $N_{\omega}$ -Nitro-Arginine mindestens eine Stunde vor Beginn der Messungen inkubiert. Nach LTP Induktion konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollwerten gefunden werden. 15 Minuten nach Tetanus betrug die normalisierte EPSP Amplitude  $148 \pm 27 \%$  ( $n = 5$ , Abbildung 24).

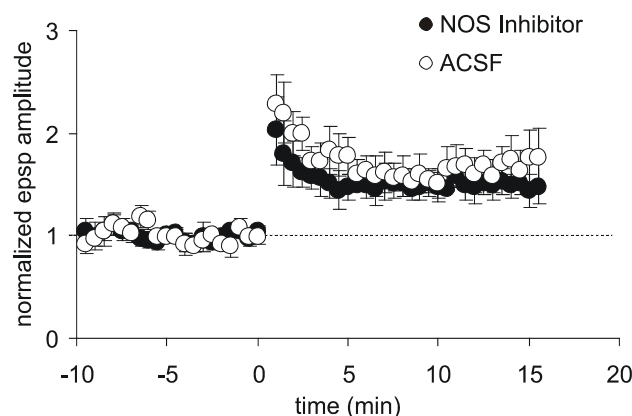


Abb. 23: Inhibition der NO-Synthetase nach Inkubation der Hirnschnitte mit  $N_{\omega}$ -Nitro-Arginine. Kein signifikanter Unterschied der LTP in regulär feuernden Zellen zu den Kontrollwerten.

#### 4.2.10 cAMP-abhängige Expression der LTP in Bursterzellen

Die Ifenprodil – Experimente sprechen für die Beteiligung von präsynaptischen NR2B an der LTP in den Bursterzellen. Die Aktivierung der NR2B-Rezeptoren führt zu einem Kalziumeinstrom und der Aktivierung einer Signalkaskade, welche für die langanhaltende Erhöhung der Transmitterfreisetzung verantwortlich ist. An den hippokampalen Moosfasern, den kortikothalamischen Synapsen, sowie den Parallelfasern im Zerebellum spielt cAMP für die Expression der LTP eine wichtige

Rolle (Castro-Alamancos & Calcagnotto, 1999; Salin *et al.*, 1996; Weisskopf *et al.*, 1994). Während eines Tetanus gelangt Kalzium in die Präsynapse und bindet an Calmodulin, welches die Adenylylcyclase aktiviert, die wiederum aus Adenosintriphosphat (ATP) cAMP bildet.

Um die Beteiligung von cAMP in den beiden subikulären Zelltypen zu testen, wurde die membranpermeable Droge Forskolin verwendet. Forskolin aktiviert die Adenylylcyclase und erhöht so indirekt die cAMP-Konzentration in der Präsynapse, welche letztendlich in einer erhöhten Transmitterfreisetzung mündet.

Die Applikation von Forskolin (50  $\mu$ M) führte in den Bursterzellen zu einem massiven Anstieg der EPSP Amplitude ( $215 \pm 19$  % nach 20 Minuten Applikationsdauer in der Gegenwart von 60  $\mu$ M APV,  $n = 7$ ,  $p = 0,0005$ , Abbildung 24 A, B). Zudem verringerte Forskolin den Doppelpulsindex von  $1,48 \pm 0,18$  auf  $0,88 \pm 0,55$  ( $p = 0,009$ , Abbildung 24 D) übereinstimmend mit einem präsynaptischen Wirkort von Forskolin. Im Anschluss wurde der alveäre Eingang tetanisch gereizt. Falls Forskolin und elektrische Reizung die synaptische Transmission über denselben Mechanismus langanhaltend verstärken, dürfte der Tetanus zu keiner weiteren Potenzierung der Antwort führen. In der Tat erhöhte sich die EPSP Amplitude nach hochfrequenter Reizung nicht signifikant gegenüber den Werten nach Applikation von Forskolin ( $242 \pm 42\%$  15 Minuten nach dem Tetanus vs.  $215 \pm 19$  % nach Forskolin Applikation,  $n = 7$ ,  $p = 0.25$ ).

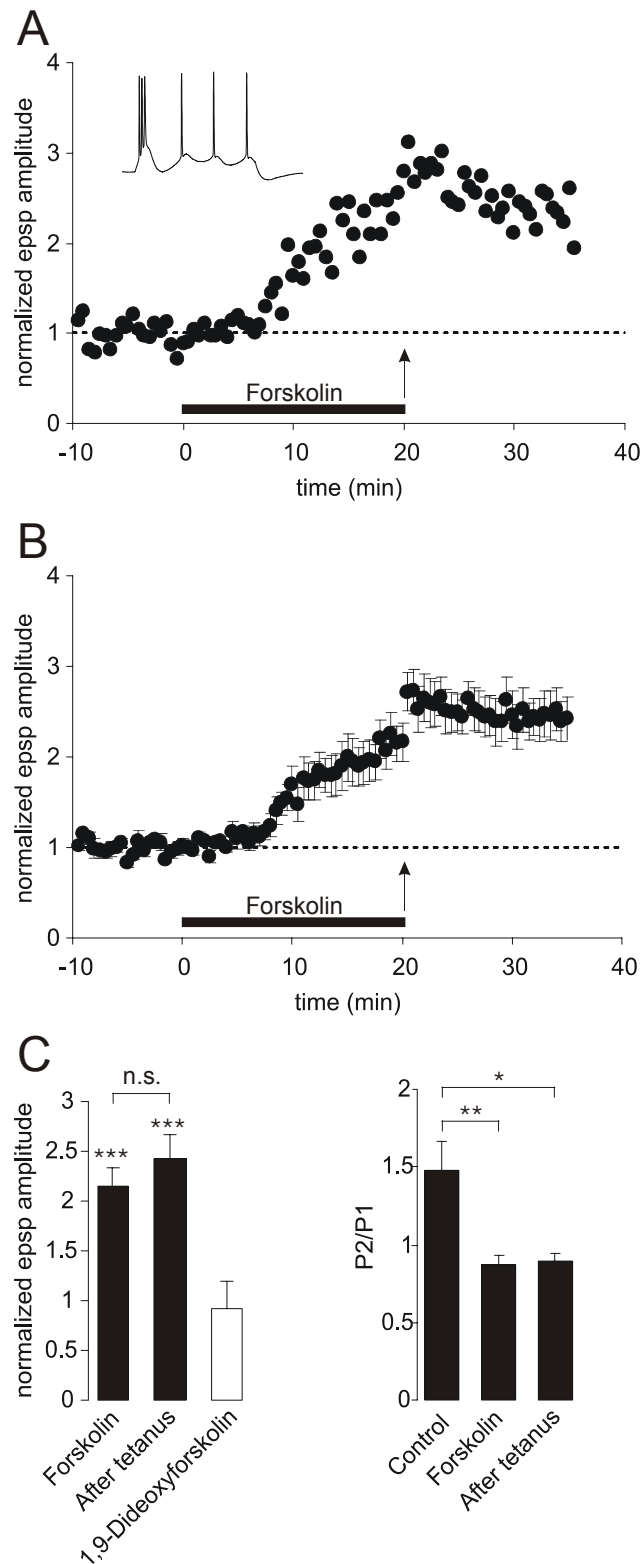


Abb. 24: cAMP-abhängige Expression der LTP in Bursterzellen. (A): Forskolin-induzierte Verstärkung der synaptischen Transmission. Nach 20 Minuten Applikationsdauer tetanische Reizung. Es konnte keine signifikante Potenzierung nach dem Tetanus nachgewiesen werden. (B,C): Der Doppelpulsindex zeigte eine hoch signifikante Änderung nach Badapplikation von Forskolin ( $n = 7$ ). (C): Zusammenfassung der Experimente in Gegenwart von  $60 \mu\text{M}$  APV.

Um eine postsynaptische Aktivierung von NMDAR zu verhindern, wurden diese Experimente in Gegenwart von APV in einer Konzentration von 60  $\mu\text{M}$  durchgeführt.

Um beschriebene unspezifische Effekte auf Kaliumkanäle auszuschließen (Hoshi *et al.*, 1988), wurde das inaktive Forskolinanalogon 1,9-Dideoxyforskolin (50  $\mu\text{M}$ ) appliziert. Dies führte nicht zu einer Potenzierung der synaptischen Antworten ( $92 \pm 13\%$ ,  $n = 4$ , Abbildung 24 C).

#### 4.2.11 Effekt von Forskolin in regulär feuernenden Zellen

Im Gegensatz zu den Bursterzellen erhöhte sich die EPSP Amplitude in den regulär feuernenden Zellen nach Forskolingabe lediglich moderat ( $146 \pm 13\%$ ,  $n = 6$ ,  $p = 0,006$ , Abbildung 25). Es zeigte sich, dass der EPSP Anstieg signifikant geringer ausgeprägt war als in den Bursterzellen ( $p = 0,015$ , Abbildung 25 A). Übereinstimmend mit einem präsynaptischen Wirkort änderte sich der Doppelpulsindex signifikant von  $1,3 \pm 0,11$  auf  $0,84 \pm 0,13$  ( $n = 6$ ,  $p = 0,028$ , Abbildung 25 B). Nach 20 minütiger Applikationsdauer wurde der alveäre Eingang tetanisch gereizt. Im Gegensatz zu den Bursterzellen konnte die synaptische Antwort in regulär feuernenden Zellen um weitere 50 % elektrisch potenziert werden ( $199 \pm 27\%$ , 10 Minuten nach Tetanus,  $n = 6$ ,  $p = 0,056$ ). Die Abbildung 25 zeigt ein typisches Beispiel.

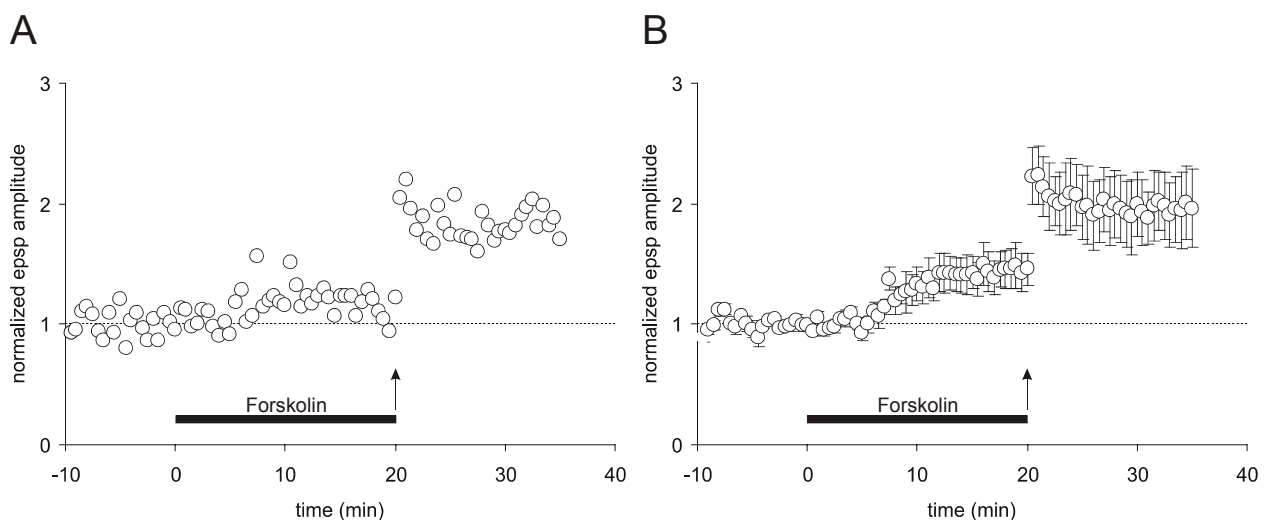


Abb. 25: Effekte von Forskolin auf EPSP Amplitude in regulär feuernenden Zellen. (A): Beispielzelle. (B): Zusammenfassung von  $n = 6$  regulär feuernenden Zellen.

Zusammenfassend deuten die vorliegenden Daten darauf hin, dass präsynaptische Endigungen, die auf Bursterzellen projizieren, über einen erhöhten Gehalt an Adenylylcyclase verfügen als präsynaptische Endigungen, die synaptische Kontakte mit regulär feuernenden Zellen eingehen. Der unterschiedliche Gehalt an Adenylylcyclase spiegelt sich in einer verschieden starken Ausprägung der Potenzierung nach Forskolinapplikation wider (Abbildung 26 A). Des weiteren kann in regulär feuernenden Zellen die chemische Potenzierung elektrisch durch eine tetanische Reizung weiter potenziert werden. Die chemische und elektrische Potenzierung beruhen in regulär feuernenden Zellen somit auf zwei verschiedenen Mechanismen.

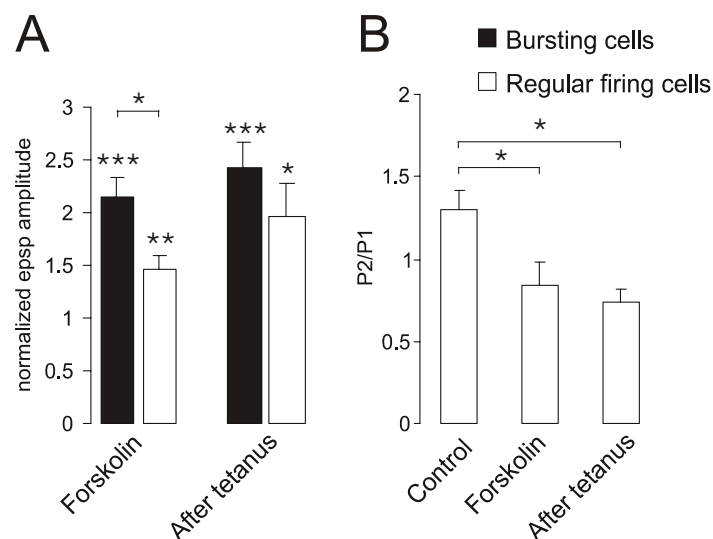


Abb. 26: Zusammenfassung der normalisierten EPSP Amplituden nach Applikation von Forskolin. (A): zellspezifische Potenzierung. (B): Doppelpulsindex in regulär feuernenden Zellen.

#### 4.2.12 Rolle des $H$ -Stromes in subikulärer LTP

Für die präsynaptisch induzierte LTP der Moosfasersynapse der Area CA3 konnte gezeigt werden, dass der Kationenkanal  $I_h$  an der Expression der Moosfaser-LTP beteiligt ist (Huang & Hsu, 2003; Mellor *et al.*, 2002) aber siehe (Chevalleyre & Castillo, 2002). In Gegenwart des  $I_h$ -Blockers Cäsium (3 mM) konnte in Bursterzellen allerdings weiterhin eine LTP ausgelöst werden ( $n = 2$ ; Abbildung 27 B). Als Kontrolle der Wirksamkeit der Droge zeigte sich nach Einwaschen eine Vergrößerung des Eingangswiderstandes (Abbildung 27 A).

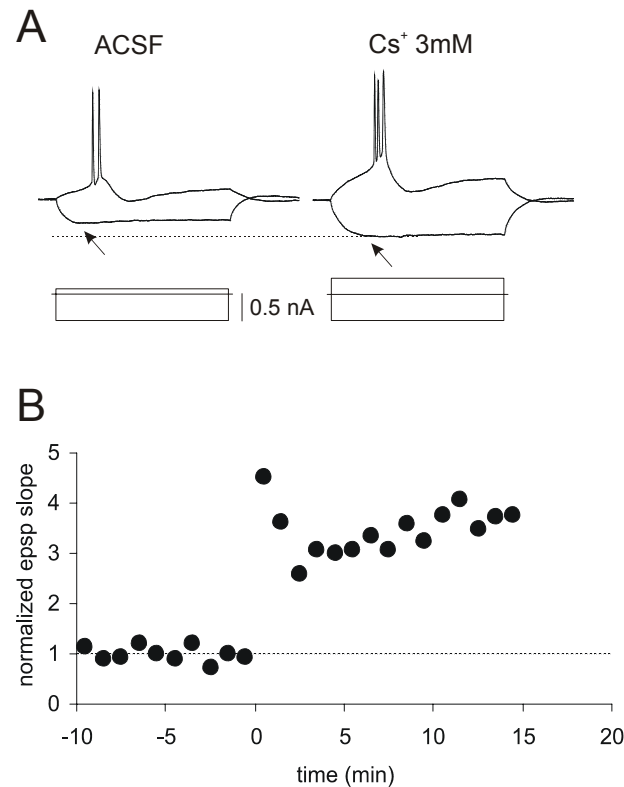


Abb. 27: Einfluss des  $I_h$ -Blockers  $\text{Cs}^+$  (3 mM) auf LTP in Bursterzellen. (A): Cäsium erhöhte den Eingangswiderstand (Pfeile). (B): LTP Protokoll in Gegenwart von  $\text{Cs}^+$  und APV (60  $\mu\text{M}$ ).

### 4.3 Untersuchungen zur Kurzzeitplastizität im Subikulum der Ratte

Im Folgenden wurde die Hypothese geprüft, ob sich im Subikulum der Ratte neben der zellspezifischen LTP auch Hinweise auf eine zellspezifische Kurzzeitplastizität finden.

Aus diesem Grunde wurde eine Versuchsreihe mit Doppelpulsexperimenten durchgeführt. Die Interstimulusintervalle (ISI) betrugen 20, 50 und 100 ms. In allen drei Gruppen fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Zelltypen. Nach Stimulation eines Doppelpulses mit 20 ms dauerndem ISI betrug der Doppelpulsindex in den regulär feuern Zellen  $1,93 \pm 0,20$  ( $n = 7$ ) und in den Bursterzellen  $1,80 \pm 0,26$  ( $n = 9$ ,  $p = 0,71$ , Abbildung 28 A), nach Stimulation eines Doppelpulses mit 50 ms dauerndem ISI in den regulär feuern Zellen  $1,48 \pm 0,14$  ( $n = 7$ ) und in den Bursterzellen  $1,63 \pm 0,15$  ( $n = 9$ ,  $p = 0,48$ , Abbildung 28 A) und schließlich nach Stimulation eines Doppelpulses mit 100 ms dauerndem ISI in den regulär feuern Zellen  $1,33 \pm 0,09$  ( $n = 6$ ) und in den Bursterzellen  $1,29 \pm 0,09$  ( $n = 8$ ,  $p = 0,73$ , Abbildung 28 A).

Es ist bekannt, dass bei geringer Amplitude des ersten EPSP das darauffolgende EPSP in Übereinstimmung mit der „residualen Kalzium-Hypothese“ umso größer ist (Debanne *et al.*, 1996; Zucker & Regehr, 2002). Aus diesem Grund wurde während der Experimente darauf geachtet, dass die Amplitude des ersten EPSPs zwischen beiden Zelltypen nicht signifikant unterschiedlich war.

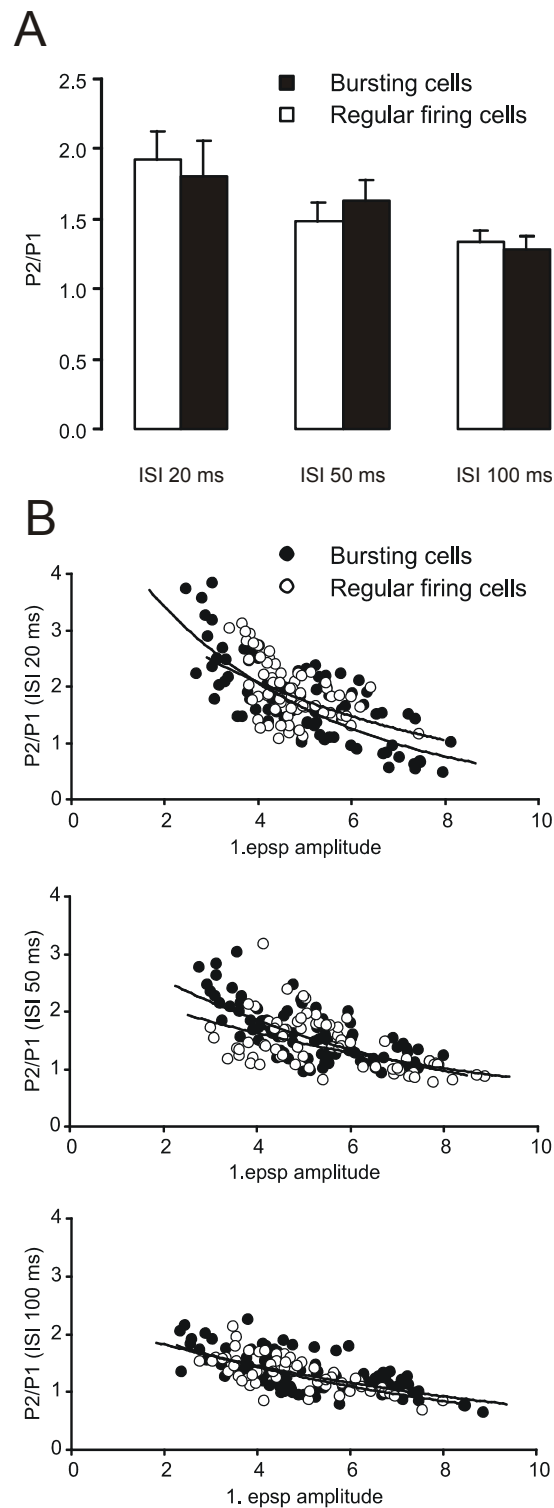


Abb. 28: Kurzzeitplastizität im Subikulum. (A): Doppelpulsexperimente mit Interstimulusintervallen (ISI) von 20, 50 und 100 ms. Es fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Zelltypen. (B<sub>1</sub>-B<sub>3</sub>): Auftragung der Größe des ersten EPSP gegenüber dem Doppelpulsindex. In allen drei Gruppen fand sich ein negativ proportionaler Zusammenhang.

Um den Zusammenhang zwischen der ersten EPSP Amplitude und dem Doppelpulsindex aufzuzeigen, wurden die beiden Größen grafisch gegeneinander aufgetragen (Abbildung 28 B<sub>1</sub>-B<sub>3</sub>). In allen drei Gruppen ergab sich in Übereinstimmung mit der „residualen Kalzium-Hypothese“ ein negativ exponentieller Zusammenhang.

Zusammenfassend zeigten die Doppelpulsexperimente somit keine zellspezifischen Unterschiede.

#### **4.4 Charakterisierung des alveären Eingangs in das Subikulum in Pilocarpin-behandelten Tieren**

Alveäre Stimulation erzeugte im Kontrollgewebe eine EPSP/IPSP Sequenz, bei erhöhter Stimulationsstärke Aktionspotentiale (APs) (Abbildung 29 A). Im Pilocarpin-behandelten Tier fand sich dagegen in einigen Zellen ein doppelgipfliges EPSP (Abbildung 29 B<sub>1</sub>, Pfeile). Bei erhöhter Stimulationsstärke feuerte die Zelle ein AP auf das zweite EPSP (n = 3 von 9 Zellen, 8 Tiere). In den Zellen, die lediglich ein EPSP auf einen Stimulus zeigten, konnte ein doppelgipfliges EPSP durch die Applikation des GABA<sub>A</sub>-Antagonisten Bicuculline erzeugt werden (n = 5).



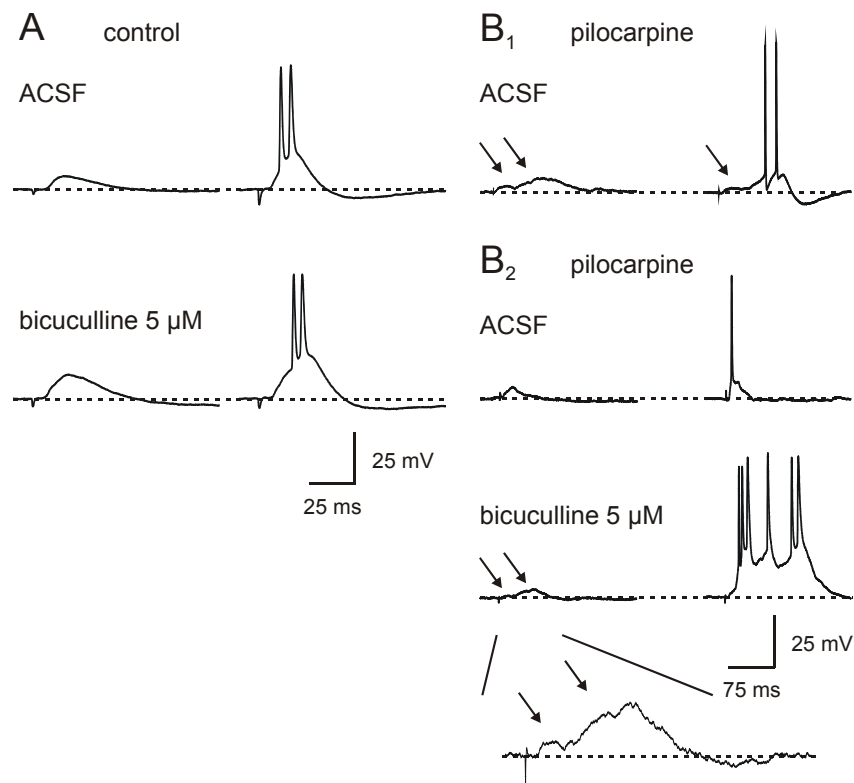


Abb. 29: Charakterisierung synaptisch evozierter Potentiale im Subikulum Pilocarpin-behandelter Tiere. (A): Alveäre Stimulation erzeugte im Kontrollgewebe ein EPSP, bei steigender Stimulationsstärke ein Burst von Aktionspotentialen. (B<sub>1</sub>): im Pilocarpin-behandelten Tier fand sich ein doppelgipfliges EPSP (Pfeile), bei erhöhter Stimulationsstärke feuerte die Zelle ein AP auf das zweite EPSP. (B<sub>2</sub>): In den Zellen, die lediglich ein EPSP auf einen Stimulus zeigten, konnte ein doppelgipfliges EPSP durch die Applikation des GABA<sub>A</sub>-Antagonisten Bicuculline erzeugt werden. Man beachte die unterschiedliche Zeitskala zwischen A und B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>.

Das zweite EPSP zeigte Eigenschaften eines polysynaptischen Signals (Miles & Wong, 1987a).

In Abbildung 30 ist eine Zelle dargestellt, die auf einen Stimulus nach einer Latenz von ungefähr 80 ms mit einem Aktionspotential antwortet ohne dass ein EPSP diesem voranging. Bei steigender Stimulationsstärke verkleinerte sich die Latenz zum AP und ein initiales EPSP kam zum Vorschein (Abbildung 30, Pfeil). Die Abnahme der Latenz synaptisch evozierter Potentiale bei steigender Stimulationsintensität deuten auf ein polysynaptisches Signal hin.

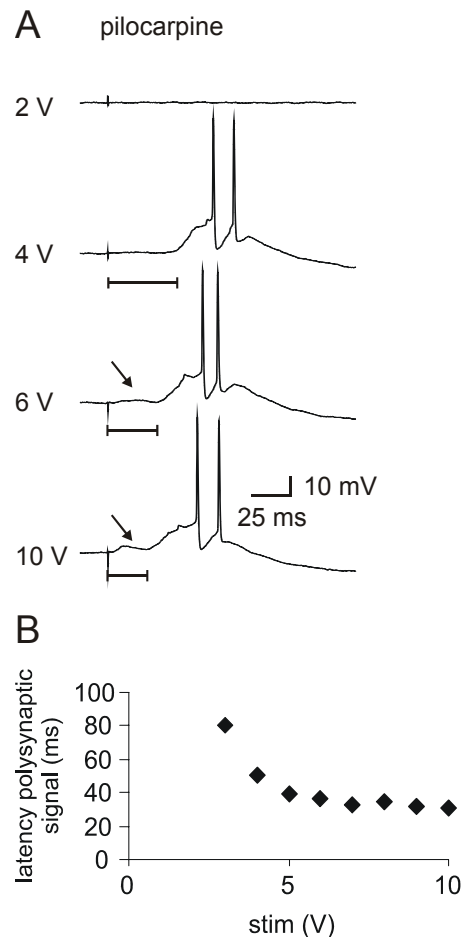


Abb. 30: Polysynaptische Signale nach Alveusstimulation im Pilocarpin-behandelten Tier. Bei niedriger Stimulationsstärke konnte kein EPSP aufgezeichnet werden (2V), bei Erhöhung antwortete die Zelle nach dem „Alles-oder-nichts“ Prinzip (4V). Bei erhöhter Stimulationsintensität zeigte sich ein initiales EPSP (6,10V). (B): Abnahme der Latenz synaptisch evozierter Potentiale bei steigender Stimulationsintensität deuten auf ein polysynaptisches Signal hin. Aufzeichnungen unter GABA<sub>A</sub>-Rezeptor Blockade.

## 4.5 Langzeitpotenzierung in Pilocarpin-behandelten Tieren

Analog zu den Untersuchungen im Kontrolltier wurden extra-, wie intrazelluläre Messungen zur synaptischen Langzeitplastizität in Pilocarpin-behandelten Tieren durchgeführt. Nach tetanischer Reizung zeigte sich, dass zwar eine posttetanische Potenzierung auslösbar war, die synaptische Übertragungsstärke aber nicht dauerhaft erhöht blieb.

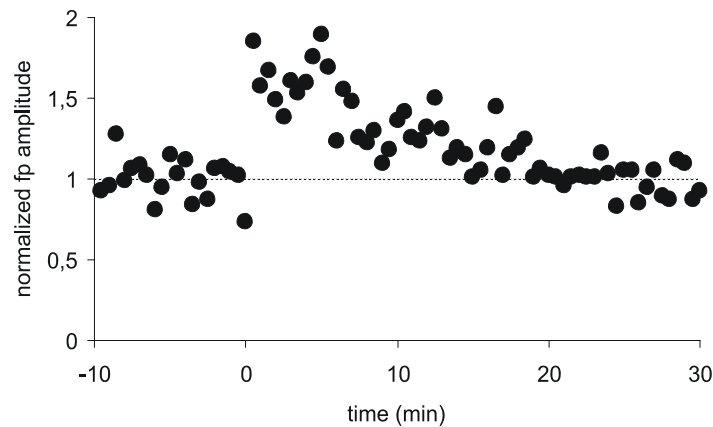


Abb. 31: Beispiel einer extrazellulären Ableitung im Pilocarpin-behandelten Tier. Populationspike erreichte zwanzig Minuten nach tetanischer Reizung wieder das Ausgangsniveau. Aufzeichnungen in ACSF.

Sowohl in den extra-, als auch in den intrazellulären Ableitungen zeigte sich, dass 15 bis 20 Minuten nach dem Tetanus der Populationsspike, bzw. die EPSP-Amplitude wieder auf das Ausgangsniveau gefallen waren (Abbildung 31 – 33). Interessanterweise konnte in einigen Fällen nach tetanischer Potenzierung doppelgipflige EPSPs aufgezeichnet werden. Diese ähneln den in Kapitel 4.4 beschriebenen Potentialen Pilocarpin-behandelter Tiere auf einen Einzelreiz.

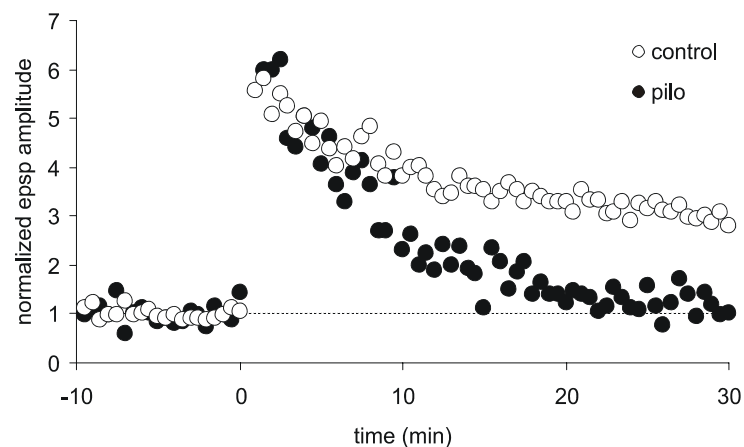


Abb. 32: Vergleich von Bursterzellen im Pilocarpin-behandelten Tier und Kontrolltieren. Abfall der EPSP-Amplitude im Pilocarpin-behandelten Tieren innerhalb von 20 Minuten. Im Kontrolltier zeigte sich hingegen eine stabile Potenzierung (Kapitel 4.2). Aufzeichnungen in Gegenwart des GABA<sub>A</sub>-Rezeptor Antagonisten BCM.

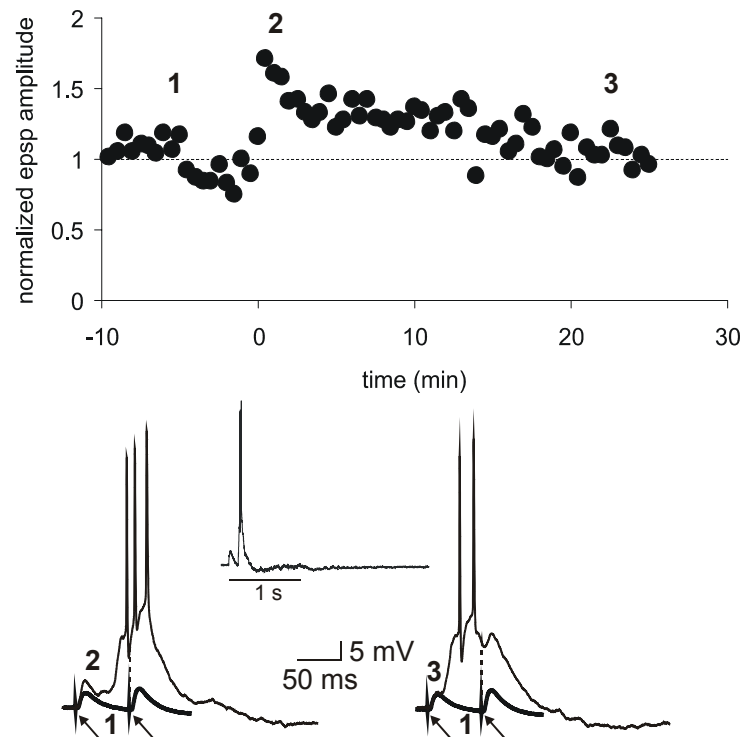


Abb. 33: Beispiel einer regulär feuernenden Zelle im Pilocarpin-behandelten Tier. Vor Induktion der LTP (fette Linie) zeigte sich kein offensichtlicher Unterschied im Vergleich zum Kontrolltier. Nach Potenzierung wurden Aktionspotentiale vor der 2. Stimulation aufgezeichnet. Inlay: EPSPs während tetanischer Reizung. Bereits nach wenigen Pulsen zeigten sich Aktionspotentiale. Aufzeichnungen unter GABA<sub>A</sub>-Rezeptor Blockade.

Nimmt man an, dass die doppelgipfligen Antworten polysynaptischer Natur sind, so scheint es, dass synaptisch latente Verbindungen nach tetanischer Reizung funktionell aktiv werden und ein Aktionspotential oder einen Burst von Aktionspotentialen induzieren (Abbildung 33). In einigen Hirnschnitten waren diese polysynaptischen Verbindungen bereits vor Tetanisierung aktiviert (Abbildung 29 B<sub>1</sub>), in anderen durch die Blockade der GABA<sub>A</sub>-vermittelten Transmission aktivierbar. Im Kontrolltier konnte die polysynaptische Exzitation durch eine pharmakologische Inhibition der GABAergen Transmission nicht induziert werden (Abbildung 29 A). Zukünftige Experimente werden in Kombination mit histologischen Methoden zeigen, ob rekurrente Verschaltungen diese polysynaptischen Signale erklären können. Inwiefern im hippocampalen Hirnschnitt Pilocarpin-behandelter Tiere bereits rekurrente, aktivierbare Verbindungen existieren, bleibt ebenfalls zu klären.

## 4.6 Charakterisierung humaner subikulärer Zellen

Während das Verhältnis Bursterzellen zu regulär feuernenden Zellen im Kontrollgewebe der Ratte zwei zu eins beträgt (O'Mara *et al.*, 2001), konnten wir mit Hilfe intrazellulärer Ableitungen an Operationsresektaten von Patienten mit pharmakoresistenter Temporallappenepilepsie (TLE) zeigen, dass sowohl im AHS wie auch im Non-AHS Gewebe (siehe Einleitung Kapitel 1.10) die Mehrzahl der Zellen als intrinsisch regulär feuernend beschrieben werden konnten. Im AHS Gewebe (Wyler Grad W0 – W2) waren 75% der Zellen regulär feuernende ( $n = 18$ ) und 25% der Zellen Bursterzellen ( $n = 6$ ). Im Non-AHS Gewebe betrug der Anteil der regulär feuernenden Zellen 79% ( $n = 15$ ). Der Anteil der Bursterzellen betrug 21% ( $n = 4$ , Abbildung 34).

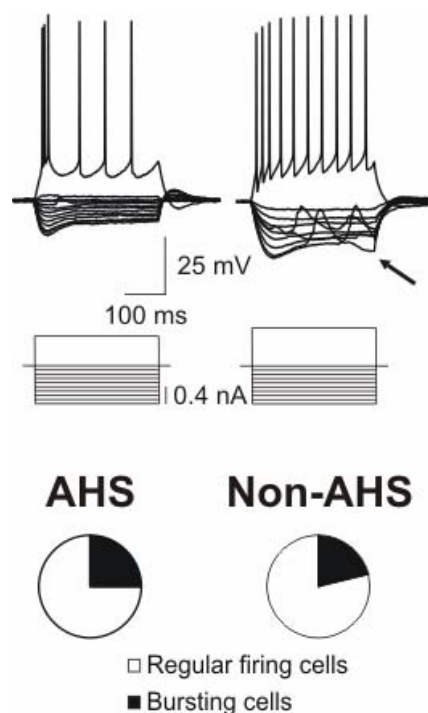


Abb. 34: Charakterisierung humaner subikulärer Pyramidalzellen. (A): Bursterzellen und regulär feuernende Zellen. (B): Im AHS Gewebe betrug der Anteil regulär feuernender Zellen 75 %, ( $n = 18$ ) und im Non-AHS Gewebe 79 % ( $n = 15$ ). Pfeil: spontane interiktale Aktivität.

Eine Aufteilung der Zelltypen nach dem Grade der Wyler Klassifikation zeigte in allen vier Gruppen eine vergleichbare Verteilung zugunsten der regulär feuernenden Zellen (Abbildung 35).

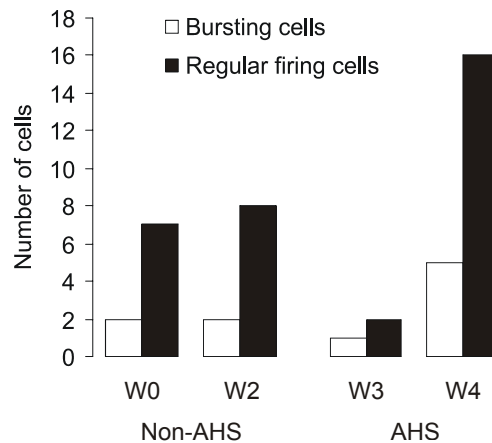


Abb. 35: Anzahl der Zellen in Abhängigkeit vom Wylergrad.

Im AHS Gewebe hatten regulär feuernde Zellen ein Ruhemembranpotential von  $-68,4 \pm 1,1$  mV und einen Eingangswiderstand von  $35,6 \pm 3,4$  M $\Omega$  ( $n = 18$ ). Bursterzellen zeigten ein vergleichbares Ruhemembranpotential von  $-68,7 \pm 2,6$  mV ( $n = 6$ ,  $p = 0,40$ ) und einen vergleichbaren Eingangswiderstand von  $29,6 \pm 3,6$  M $\Omega$  ( $n = 6$ ,  $p = 0,41$ ). Im Non-AHS Gewebe zeigten regulär feuernde Zellen ein Ruhemembranpotential von  $-69,3 \pm 1,0$  mV und einen Eingangswiderstand von  $34,8 \pm 3,3$  M $\Omega$  ( $n = 15$ ), Bursterzellen ein Ruhemembranpotential von  $-64,0 \pm 3,6$  mV ( $n = 4$ ,  $p = 0,23$ ) und einen Eingangswiderstand von  $23,8 \pm 4,2$  M $\Omega$  ( $n = 4$ ,  $p = 0,08$ ). Zwischen regulär feuernenden Zellen des AHS und Non-AHS Gewebe fand sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied des Ruhemembranpotentials und des Eingangswiderstandes.

#### 4.7 Spontane epileptische Aktivität im humanen Subikulum

Interessanterweise konnte in 56 % der subikulären Zellen im AHS Gewebe ( $n = 10$  von 18) und in 28 % der Zellen im Non-AHS Gewebe ( $n = 5$  von 18) interiktale Aktivität aufgezeichnet werden. Die Aktivität bestand aus rhythmischen EPSP/IPSP Sequenzen im Bereich von 0,75 bis 3 Hz. Die in-vitro Daten korrelierten in ihrem Auftreten sehr gut mit den EEG-Ableitungen, die ebenfalls interiktale Aktivität zeigten (Abbildung 36). Aktionspotentiale konnte lediglich in einer Zelle beobachtet werden. Diese zeigte aber keine typischen Merkmale einer Schrittmacherzelle, da die Aktionspotentiale asynchron auftraten. Es zeigte sich keine Korrelation zur unterliegenden EPSP/IPSP Aktivität.

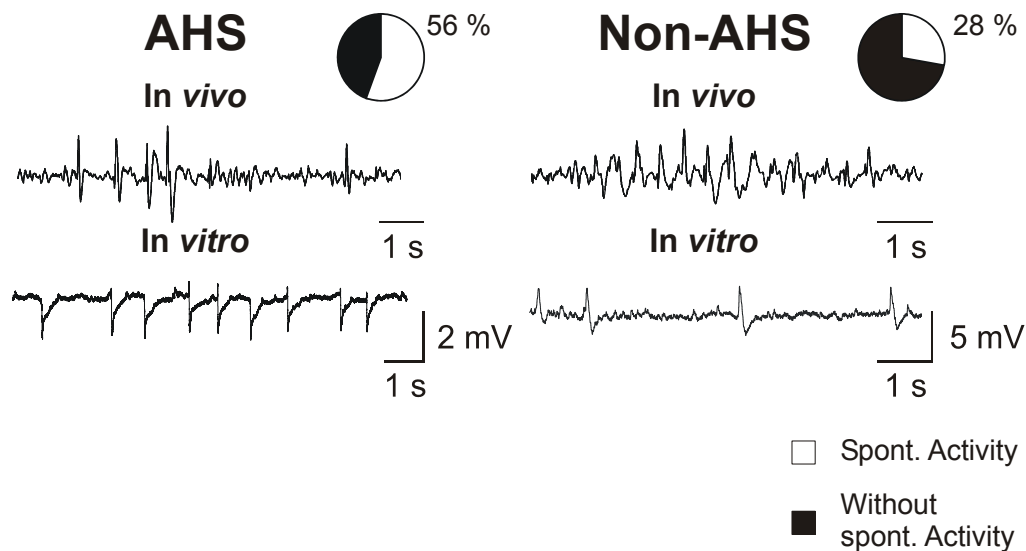


Abb. 36: Spontane interiktale Aktivität im humanen Subikulum. Im AHS-Gewebe zeigten 56% der abgeleiteten Zellen spontanen interiktalen Aktivität, im Non-AHS-Gewebe 28% der Zellen. Diese *in vitro*-Aktivität korrelierte sehr gut mit den EEG-Ableitungen (*in vivo*). [Die EEG-Ableitungen, sowie deren Auswertung wurden von Herrn Dr. C. Dehnicke, EZBB, sowie Herrn Dr. T.-N. Lehmann, Charité, Neurochirurgie, durchgeführt].

Die inhibitorische, bzw. exzitatorische interiktale Aktivität konnte durch Applikation des GABA<sub>A</sub>-Rezeptor Antagonisten Bicuculline (5  $\mu$ M), bzw. des AMPA/Kainat-Rezeptor Antagonisten NBQX (10  $\mu$ M) blockiert werden (Abbildung 37). Der NMDA-Rezeptor Antagonist APV hatte keinen Einfluss auf die Amplitude und Frequenz der interiktalen Aktivität.

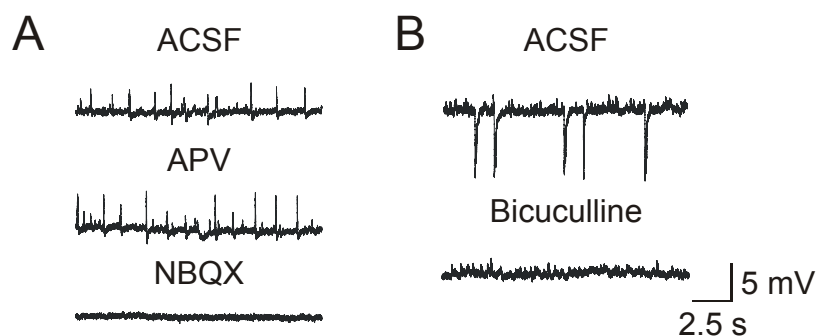


Abb. 37: Interiktale Aktivität wurde durch den AMPAR-Antagonist NBQX (A) sowie den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor Antagonist Bicuculline geblockt (B).

Im nächsten Schritt wurde die Spannungsabhängigkeit der spontanen, interiktalen Aktivität untersucht. Bei Ruhemembranpotential zeigten sich inhibitorische Ereignisse, die bei hyperpolarisierenden Haltepotentialen depolarisierend und bei

depolarisierten Haltepotentialen verstärkt hyperpolarisierend waren. Im dargestellten Beispiel in Abbildung 38 wurden ein Gleichgewichtspotential von  $-76,3$  mV ermittelt, welches dem GABAergen Gleichgewichtspotential sehr nahe ist.

Cohen und Kollegen beschrieben evozierte exzitatorische Potentiale in humanen subikulären Pyramidalzellen, die durch den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor Antagonisten BCM blockierbar waren. Zudem zeigten diese synaptisch evozierten Signale eine Spannungsabhängigkeit, welche auf ein in depolarisierende Richtung verschobenes Gleichgewichtspotentials schließen ließ. Cohen und Kollegen konnten zudem Schrittmacherzellen nachweisen, welche elektrophysiologische Eigenschaften von Interneuronen aufweisen (Cohen *et al.*, 2002). Wie oben beschrieben, fand sich in dieser Studie hingegen kein Hinweis auf depolarisierende GABA<sub>A</sub>-Rezeptor vermittelte Antworten.

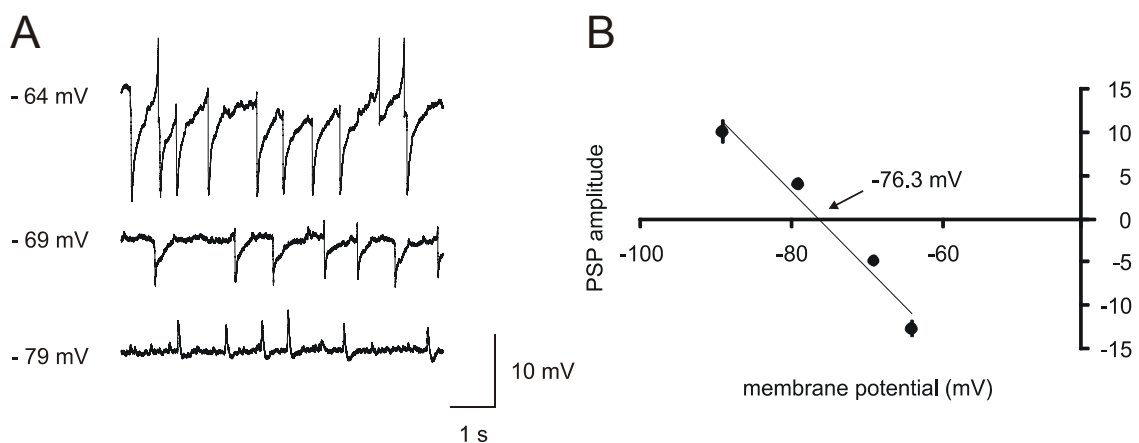


Abb. 38: Spannungsabhängigkeit der spontanen, interiktalen Aktivität. (A): Beispiel bei Ruhemembranpotential von  $-69$  mV. Depolarisierung auf  $-64$  mV verstärkte die hyperpolarisierenden Ereignisse. Hyperpolarisierung auf  $-79$  mV zeigte depolarisierende Ereignisse. (B): Grafische Auftragung der gemessenen Ereignisse gegenüber dem Haltepotential. Es ergibt sich ein Umkehrpotential von  $-76,3$  mV.

#### 4.8 Nachhyperpolarisation humaner subikulärer Zellen

Wie in der Einleitung beschrieben, spielen Nachhyperpolarisationen in der Regulation neuronaler Erregbarkeit eine besondere Rolle (Einleitung Kapitel 1.9). Auf einen depolarisierenden Puls folgen eine schnelle und eine langsame Nachhyperpolarisation. Im Folgenden wurden verschiedene Pulsdauern depolarisierender Ströme gewählt und die Amplitude beider Formen der



Nachhyperpolarisation bestimmt. Es fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen AHS und Non-AHS Gewebe in den Pulsdauern 50, 500 und 1000 ms. Lediglich bei einer Pulsdauer von 20 ms zeigte sich eine signifikant vergrößerte schnelle Nachhyperpolarisation (fAHP) im Non-AHS Gewebe. Die folgende Tabelle 3 fasst alle Daten zusammen.

|                   |         | <b>AHS</b><br>Regular firing cells | <b>Non-AHS</b><br>Regular firing cells |
|-------------------|---------|------------------------------------|--|
| <b>RMP (mV)</b>   |         | - 68.4 ± 1.1 (n = 18)              | - 69.3 ± 1.0 (n = 15)                  |
| <b>Inres (MΩ)</b> |         | 35.6 ± 3.4 (n = 18)                | 34.8 ± 3.3 (n = 15)                    |
| <b>fAHP (mV)</b>  | 20 ms   | 2.0 ± 0.4 (n = 12)                 | 3.2 ± 0.5 (n = 9) *                    |
|                   | 50 ms   | 3.4 ± 0.7 (n = 6)                  | 4.9 ± 0.7 (n = 7)                      |
|                   | 500 ms  | 4.3 ± 0.5 (n = 11)                 | 4.9 ± 0.7 (n = 9)                      |
|                   | 1000 ms | 5.4 ± 0.6 (n = 15)                 | 5.3 ± 0.7 (n = 8)                      |
| <b>sAHP (mV)</b>  | 20 ms   | 0.2 ± 0.1 (n = 12)                 | 0.8 ± 0.3 (n = 9)                      |
|                   | 50 ms   | 0.4 ± 0.2 (n = 6)                  | 0.7 ± 0.3 (n = 7)                      |
|                   | 500 ms  | 0.9 ± 0.3 (n = 11)                 | 1.7 ± 0.4 (n = 9)                      |
|                   | 1000 ms | 1.8 ± 0.5 (n = 15)                 | 1.9 ± 0.4 (n = 8)                      |

Tabelle 3: Intrinsische Eigenschaften humaner subikulärer Zellen in Abhängigkeit vom Wylergrad (\*: p = 0.047). Abkürzungen: RMP: Ruhemembranpotentials, Inres: Eingangswiderstand, fAHP: schnelle Nachhyperpolarisation, sAHP: langsame Nachhyperpolarisation.

Eine Unterscheidung in spontan aktive und nicht aktive Zellen, unabhängig von dem Wyler Grad, zeigte jedoch eine hochsignifikante Abnahme der schnellen und langsamen Nachhyperpolarisation bei 1000 ms Pulsdauer (Abbildung 39, Tabelle 4). Bei Pulsen von 20 bis 500 ms Dauer zeigten sich in spontan aktiven Zellen zwar tendenziell, aber nicht signifikant geringere Werte für die schnelle und langsame Nachhyperpolarisation.

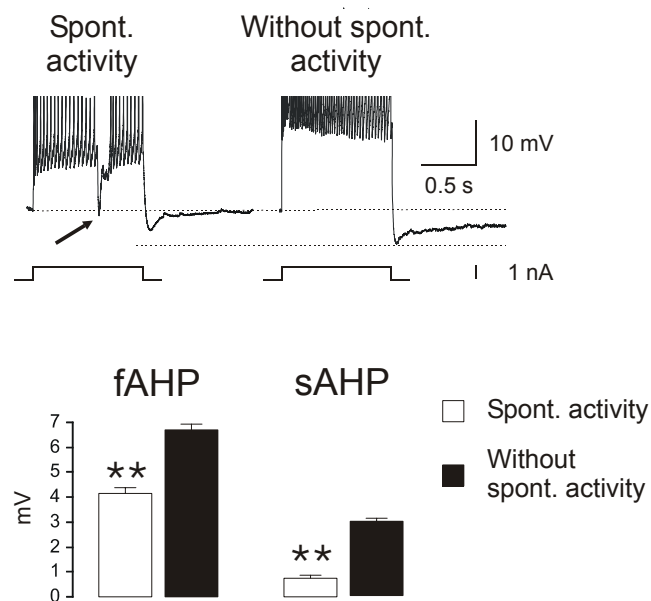


Abb. 39: Nachhyperpolarisation humaner subikulärer Zellen in Abhängigkeit vom spontanen Entladungsverhalten. Der Pfeil in der Abbildung zeigt spontane interiktale Aktivität.

|                  |         | <b>Spontaneous activity</b><br>AHS and Non-AHS | <b>No activity</b><br>AHS and Non-AHS | <b>p=</b>     |
|------------------|---------|--|---------------------------------------|---------------|
| <b>fAHP (mV)</b> | 20 ms   | $2.4 \pm 0.2$ (n = 9)                          | $2.7 \pm 0.1$ (n = 11)                | 0.64          |
|                  | 50 ms   | $3.9 \pm 0.4$ (n = 5)                          | $4.4 \pm 0.2$ (n = 8)                 | 0.71          |
|                  | 500 ms  | $3.9 \pm 0.2$ (n = 8)                          | $4.9 \pm 0.2$ (n = 12)                | 0.22          |
|                  | 1000 ms | $3.9 \pm 0.2$ (n = 9)                          | $6.3 \pm 0.2$ (n = 12)                | <b>0.0085</b> |
| <b>sAHP (mV)</b> | 20 ms   | $0.2 \pm 0.1$ (n = 9)                          | $0.6 \pm 0.1$ (n = 4)                 | 0.16          |
|                  | 50 ms   | $0.2 \pm 0.1$ (n = 5)                          | $0.8 \pm 0.1$ (n = 8)                 | 0.12          |
|                  | 500 ms  | $1.0 \pm 0.1$ (n = 8)                          | $1.5 \pm 0.1$ (n = 12)                | 0.20          |
|                  | 1000 ms | $0.7 \pm 0.1$ (n = 9)                          | $2.8 \pm 0.1$ (n = 12)                | <b>0.0018</b> |

Tabelle 4: Nachhyperpolarisation humaner subikulärer Zellen in Abhängigkeit vom spontanen Entladungsverhalten. Abkürzungen: fAHP: schnelle Nachhyperpolarisation, sAHP: langsame Nachhyperpolarisation.

## 5. Diskussion

### 5.1 Zellspezifische Langzeitplastizität im Subikulum der Ratte

Bursterzellen und regulär feuernde Zellen zeigten nach Tetanisierung ein unterschiedliches Ausmaß der Potenzierung synaptischer Antworten. Die Versuche dieser Arbeit legen den Schluss nahe, dass Axone von Pyramidalzellen der Area CA1 selektiv auf subikuläre Pyramidenzellen projizieren und so den hippocampalen Informationsfluss steuern und regulieren können. NMDA-Rezeptoren auf beiden Seiten des synaptischen Spaltes spielen hier eine besondere Rolle.

Bislang sind wenig zellspezifische Unterschiede zwischen beiden subikulären Pyramidalzellen bekannt. Mason, Stewart und Wong, sowie Taube haben zu Beginn der neunziger Jahre erstmalig beide Zelltypen elektrophysiologisch charakterisiert (Mason, 1993; Stewart & Wong, 1993; Taube, 1993). Offensichtliche Unterschiede der Membran-, sowie der synaptischen Eigenschaften konnten zwischen den beiden Zelltypen nicht festgestellt werden. Obwohl nachfolgende Studien die Existenz von Bursterzellen bestätigen konnten (Behr *et al.*, 1996; Mattia *et al.*, 1997), bleibt das Verhältnis regulär feuernder Zellen zu Bursterzellen Gegenstand der Diskussion (Menendez *et al.*, 2002). Allerdings gibt die Mehrzahl der Autoren unabhängig von der verwendeten Meßmethode (scharfe Mikroelektrode vs. patch-clamp Technik) das Verhältnis mit zwei zu eins zu Gunsten der Bursterzellen an (O'Mara *et al.*, 2001; Staff *et al.*, 2000). Vor dem Hintergrund der zellspezifischen Potenzierung, ist das Verhältnis für die Prozessierung hippocampaler Informationen von entscheidender Bedeutung.

Obgleich Taube (Taube, 1993) keine zellspezifischen Unterschiede im Bezug auf die synaptischen Antworten nach alveärer Stimulation finden konnte, beschreibt eine nachfolgende Studie einen Unterschied in der langsamen GABAergen vermittelten Neurotransmission. In regulär feuernenden Zellen fand sich nach synaptischer Stimulation subikulärer Afferenzen im Alveus ein vergrößertes GABA<sub>B</sub>-vermitteltes inhibitorisches postsynaptisches Potential. Die GABA<sub>A</sub>-vermittelte Komponente stellte sich in beiden Zelltypen identisch dar (Greene & Mason, 1996). Darüber hinaus konnte eine Beteiligung von Bursterzellen an  $\gamma$ -Oszillationen beschrieben werden (Stanford *et al.*, 1998).

Eine morphologische Untersuchung beider Zelltypen zeigte hinsichtlich Somagröße, Somaform sowie Form der dendritischen Ausläufer keine zellspezifischen Unterschiede. Lediglich die Distanz bis zum ersten dendritischen Ausläufer war in den regulär feuernenden Zellen signifikant kürzer als in Bursterzellen (Greene & Totterdell, 1997). Zudem konnten die Autoren dieser Studie eine schichtspezifische Verteilung der Zelltypen feststellen. Bursterzellen fanden sich zahlenmäßig vermehrt in der tiefen Schicht des Subikulums (alveusnah in der sogenannten polymorphen Schicht) während regulär feuernende Zellen eher in der oberflächlichen Schicht, dem Stratum moleculare zu finden waren (Greene & Totterdell, 1997). Diese Verteilung, so spekulierten die Autoren, könnte Aufschluss geben über mögliche zellspezifische Afferenzen wie auch Efferenzen. In der Tat konnte Stewart mit Hilfe antidromer Stimulation nachweisen, dass Bursterzellen selektiv in das Präsubikulum und regulär feuernende Zellen zum entorhinalen Kortex projizieren (Stewart, 1997).

Zusammenfassend bieten die vorliegende Ergebnisse ausreichend Hinweise für die Hypothese, dass subikuläre Pyramidalzellen neuronale Informationen zellspezifisch modulieren und prozessieren. Die zellspezifische Langzeitpotenzierung stützt diese Hypothese.

## **5.2 Prä- versus postsynaptische Induktion der Langzeitpotenzierung**

Es finden sich in der vorliegenden Arbeit mehrere Hinweise darauf, dass die Langzeitpotenzierung (LTP) in Bursterzellen präsynaptisch induziert und exprimiert wird. So fand sich zum einen eine hochsignifikante Änderung des Doppelpulsindex und zum anderen eine Änderung des Variationskoeffizienten. Beide Parameter unterstützen die These einer präsynaptisch exprimierten LTP (Bekkers & Stevens, 1990; Debanne *et al.*, 1996; Tsien & Malinow, 1990). Die BAPTA Experimente belegen, dass die LTP in Bursterzellen tatsächlich unabhängig Kalziumeinstrom in die Postsynapse und somit präsynaptisch induziert wird.

Die Technik der scharfen Mikroelektrode hat den Vorteil das intrazelluläre Milieu geringer zu beeinträchtigen als die patch-clamp Technik und intrazelluläre Signalkaskaden nicht auszuwaschen. Allerdings bleibt trotz der langen Dialysedauer mit dem Kalziumchelator BAPTA von einer Stunde und der hohen Konzentration von 200 mM offen, in wiefern BAPTA unter Verwendung scharfer Mikroelektroden in der Lage ist

postsynatisches Kalzium ausreichend zu puffern. Zalutsky und Nicoll konnten mit Hilfe der gleichen Technik die LTP der kommissuralen Fasern in CA3 Pyramidalzellen bei identischer BAPTA Konzentration und geringerer Dialysedauer von lediglich 20 bis 50 Minuten blockieren (Zalutsky & Nicoll, 1990). Aber selbst bei Verwendung der patch-clamp Technik ist nicht sichergestellt, dass BAPTA bis in distale Dendriten diffundiert und dort in dendritischen Ausläufern Kalzium adäquat puffert. An der hippokampalen Mossfasersynapse berichteten Yeckel und Kollegen mit einer Konzentration von 30 bis 50 mM BAPTA die LTP blockieren zu können (Yeckel *et al.*, 1999), während Mellor und Nicoll auch nach 80 Minuten Dialyse von 50 mM BAPTA weiterhin eine LTP auslösen konnten (Mellor & Nicoll, 2001).

In den regulär feuernenden Zellen ist BAPTA bei einer Dialysedauer von einer halben Stunde in der Lage die Induktion der LTP zu unterdrücken. Dies belegt, dass LTP in regulär feuernenden Zellen postsynaptisch induziert und exprimiert wird. Zudem fand sich keine Veränderung des Doppelpulsindex, allerdings inkonsistente Ergebnisse bezüglich des Variationskoeffizienten. In der Literatur findet sich nach Induktion einer LTP in der Area CA1 ebenfalls keine Veränderung des Doppelpulsindex, wohl aber eine Zunahme des Variationskoeffizienten. Diese Zunahme war allerdings geringer ausgeprägt als bei Prozessen, die ausschließlich präsynaptischer Natur sind, wie z.B. die Zunahme der EPSP-Amplitude nach Veränderung des Kalzium-Magnesiumquotienten in der extrazellulären Lösung (Manabe *et al.*, 1993). Daten zu Veränderungen des  $CV^{-2}$  nach Veränderungen des Kalzium-Magnesiumquotienten liegen für das Subikulum bislang nicht vor.

### 5.3 Beitrag von NMDA-Rezeptoren zur LTP in subikulären Zellen

Nachdem Collingridge und Kollegen in in vitro Versuchen an hippokampalen Hirnschnitten eine Beteiligung von NMDA Rezeptoren (NMDAR) an synaptischen Plastizitätsprozessen nachweisen konnten (Collingridge *et al.*, 1983), gelang es Morris und Kollegen diese Ergebnisse in vivo zu bestätigen. Die intraventrikuläre Applikation des NMDAR-Antagonisten APV führte in Ratten zu einem Verlust der Fähigkeit räumlichen Lernens (Morris *et al.*, 1986). Weitere Studien konnten eine Beteiligung von postsynaptisch lokalisierten NMDAR an der Induktion der LTP in der Area CA1

bestätigen, so dass diese Ergebnisse als gesichert gelten (Bliss & Collingridge, 1993; Malenka & Nicoll, 1999).

Der NMDAR besteht aus mehreren Untereinheiten. Man unterscheidet die Untereinheiten NR1, NR2A bis 2D und NR3. Arbeiten an rekombinanten NMDAR konnten zeigen, dass die Leitfähigkeit der Rezeptoren von der Komposition der Untereinheiten abhängig ist. Die Kinetik der NR2B – 2D-abhängigen synaptischen Antworten ist deutlich langsamer als die der NR2A Untereinheit (Cull-Candy *et al.*, 2001; Monyer *et al.*, 1994). Somit stellen gerade die Untereinheiten NR2B – 2D einen „idealen“ Rezeptor zur Detektion synaptischer Koinzidenz dar.

Entwicklungsabhängig werden postnatal und im juvenilen Alter in Ratten verstärkt die Untereinheiten NR2B bis 2D exprimiert. Adulte Tiere zeigen hingegen eine verstärkte Expression der Untereinheiten NR2A und 2B gegenüber den Untereinheiten NR2C und 2D (Hrabetova *et al.*, 2000; Monyer *et al.*, 1994). Die Expression der NR2B Untereinheit unterliegt aber ebenfalls einer ‚Downregulation‘ beim Übergang vom juvenilen zum adulten Tier (Sheng *et al.*, 1994). Spekulativ könnte diese ‚Downregulation‘ einer Abnahme der Lernfähigkeit in höherem Alter entsprechen. In der Tat konnten Tang und Kollegen mit Hilfe transgener Tiere zeigen, dass eine Überexpression der NR2B Untereinheit eine Verstärkung der LTP nach sich zieht. Die transgenen Tiere zeigten in der Tat in verschiedenen Verhaltenstests eine verbesserte Lernfähigkeit (Tang *et al.*, 1999).

In Bursterzellen des Subikulums der Ratte spielen NMDAR auf beiden Seiten des synaptischen Spaltes im Rahmen der LTP eine besondere Rolle. Präsynaptische NMDAR der Untereinheit NR2B scheinen an der LTP in Bursterzellen beteiligt zu sein und über einen Kalziumeinstrom in die Präsynapse eine langanhaltende Erhöhung der Transmitterausschüttung herbeizuführen. In Bursterzellen blockierte der selektive NR2B-Antagonist Ifenprodil die präsynaptische APV-insensitiven LTP Komponente. In regulär feuernenden Zellen hingegen hatte Ifenprodil keinen Einfluß auf die Induktion der LTP.

Bislang gibt es wenig Hinweise für eine Beteiligung präsynaptischer NMDAR im Rahmen synaptischer Plastizität. An zerebellären Synapsen der Parallelfasern auf Purkinjezellen konnte kürzlich gezeigt werden, dass präsynaptische NMDAR eine langanhaltende Depression der synaptischen Übertragung induzieren können (Casado *et al.*, 2002). In der postsynaptischen Membran der Purkinjezelle finden sich in adultem Gewebe keine NMDAR. Obwohl postnatal exprimiert, sind diese nach ungefähr einer

Woche nicht mehr nachweisbar (Farrant & Cull-Candy, 1991; Llano *et al.*, 1991). Duguid and Smart beschrieben ebenfalls erst kürzlich eine neue Form synaptischer Plastizität im Kleinhirn, die ebenfalls abhängig ist von präsynaptischen NMDAR. Eine kurzzeitige Depolarisation der zerebellären Purkinjezelle führt auf einem bisher unbekannten Weg zu einer dendritischen Glutamatfreisetzung. Glutamat bindet an präsynaptische NMDAR auf zerebellären Interneuronen und erhöht über einen Kalziumeinstrom langanhaltend die Transmitterfreisetzung. Die Autoren bezeichneten dieses Phänomen als „Depolarisation-induzierte Potenzierung der Inhibition“ (DPI) (Duguid & Smart, 2004).

Im entorhinalen Kortex der Ratte finden sich ebenfalls elektrophysiologische Hinweise auf präsynaptische NMDAR (Woodhall *et al.*, 2001). Es wurde gezeigt, dass präsynaptische NMDAR für eine passagere Potenzierung von 15 bis 20 Minuten verantwortlich sind (Solger *et al.*, 2004). Ob diese transiente Potenzierung dem ebenfalls transienten Phänomen der DPI entspricht ist unklar.

In der Amygdala konnte auch in adultem Gewebe eine Beteiligung der NR2B Untereinheit an NMDA-vermittelten postsynaptischen Signalen nachgewiesen werden (Lopez & Sah, 2003; Szinyei *et al.*, 2003). Applikation des spezifischen NR2B Antagonisten Ifenprodil in die Amygdala konnte die Aquisition von Furchtreaktionen, aber nicht deren Expression verhindern (Rodrigues *et al.*, 2001). Rosenblum und Kollegen konnten zeigen, dass es nach Sensibilisierung des Geruchsinns im insulären Kortex zu einer Phosphorylierung der NR2B Untereinheit kommt (Rosenblum *et al.*, 1997). Insgesamt mehrten sich die Hinweise auf eine Beteiligung der NR2B-Untereinheit an synaptischer Plastizität.

## 5.4 Expressionsmechanismen subikulärer LTP

Die präsynptisch exprimierte LTP in subikulären Bursterzellen zeigt Ähnlichkeiten mit der LTP der hippokampalen Moosfasern (Weisskopf *et al.*, 1994), den kortikothalamischen Fasern (Castro-Alamancos & Calcagnotto, 1999) sowie den Parallelfasern des Kleinhirns (Salin *et al.*, 1996). Diese Formen der präsynaptischen LTP sind abhängig von cAMP. Die Applikation des Adenylylcyclase Aktivators Forskolin führte in Bursterzellen zu einem massiven Anstieg der exzitatorisch postsynaptischen Antwort. Ein nachfolgender Tetanus war nicht in der Lage, die Potenzierung zu steigern.

Dies weist darauf hin, dass es sich bei der chemischen Potenzierung mit Forskolin und der elektrischen Induktion der LTP um denselben Mechanismus handelt. In regulär feuernenden Zellen erhöhte sich die synaptische Antwort nach Forskolingabe nur mäßig. Zudem konnte die Antwort weiter potenziert werden.

Mittels in-situ Hybridisierungen konnte sowohl in der Area dentata als auch in den Areae CA1 und CA3 mRNA für das Protein Adenylylcyclase I nachgewiesen werden. In der Area dentata sowie im Kleinhirn fand sich das Maximum der Signalintensität, während in den übrigen hippokampalen Arealen lediglich moderate Signale detektiert wurden (Xia *et al.*, 1991).

Interessanterweise wurde an der hippokampalen Moosfasern ebenfalls eine zielspezifische LTP beschrieben. Maccaferri und Kollegen konnten nachweisen, dass nach tetanischer Reizung von Pyramidalzellen der Area CA3 zu einer langanhaltenden Potenzierung der synaptischen Antworten auftritt, wohingegen in Interneuronen der Area CA3 die Tetanisierung zu keinem Effekt oder gar einer langanhaltenden Depression der synaptischen Übertragung führen kann. Die Autoren führten dies auf die Tatsache zurück, dass die synaptischen Terminalen je nach Zielzelle über einen unterschiedlichen Gehalt des Proteins Adenylylcyclase verfügen (Maccaferri *et al.*, 1998).

Ob im Subikulum, wie an der hippokampalen Moosfaser die vesikulären Transmittermoleküle Rab3A und Rim1 $\alpha$  eine Rolle in der LTP Expression spielen, bleibt abzuwarten. Hinweise auf eine Beteiligung des H-Stromes fanden sich im Subikulum im Gegensatz zur Moosfasersynapse (Huang & Hsu, 2003; Mellor *et al.*, 2002) nicht.

## 5.5 Pathologische Plastizität in Pilocarpin-behandelten Tieren

Eine anerkannte Theorie hinsichtlich der Entstehung einer Epilepsie beruht auf der Annahme eines Ungleichgewichts zwischen Exzitation und Inhibition. Eine Verminderung der Inhibition neuronaler Zellen, eine Disinhibition, führt zu einer Verstärkung der Exzitation und somit zu einer erhöhten Anfallsbereitschaft. In vitro Epilepsie-Modelle, die in Hirnschnittpräparaten iktale und interiktale Anfälle auslösen können, wie z.B. durch die Applikation des GABA<sub>A</sub>-Rezeptor Antagonisten Bicuculline in Kombination mit Veränderungen des extrazellulären Ionenmilieus oder das sogenannte „Niedrig-Magnesium Modell“ bauen auf dieser Hypothese auf. In der Tat konnte für das



in vivo Pilokarpin-Modell der TLE (siehe Material und Methoden Kapitel 2.3) gezeigt werden, dass inhibitorische Interneurone vulnerabler gegenüber anfallsinduziertem Zelltod sind als (exzitatorische) Pyramidalzellen und so das Ungleichgewicht begründen (Houser & Esclapez, 1996; Mello & Covolan, 1996). Neben Zelluntergängen spielen morphologische Reorganisationsphänome wie axonale Sprossung in der Anfallsgenese eine besondere Rolle (Dudek & Spitz, 1997; Prince, 1997).

Klinisch können bei Patienten mit einer TLE Lern- und Gedächtnisdefizite nachgewiesen werden. Es ist Gegenstand der Diskussion, inwiefern bestimmte Charakteristika pathologischer Plastizität denen der physiologischen Plastizität gleichen. Auf Gemeinsamkeiten des Kindling-Modells und der NMDA-abhängigen LTP wird in diesem Zusammenhang gerne verwiesen (Kullmann *et al.*, 2000). Hesse und Teyler konnten schon 1976 eine verminderte LTP nach konvulsiven Anfällen nachweisen (Hesse & Teyler, 1976). Die genauen Ursachen blieben indes unklar. Beck und Kollegen konnten diese Ergebnisse in Operationsresektaten von Patienten mit TLE bestätigen (Beck *et al.*, 2000). In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte mit Hilfe hippocampaler Schnittkulturen gezeigt werden, dass epileptiforme Aktivität zu einer NMDAR-abhängigen Vergrößerung der AMPAR-vermittelten Neurotransmission führt und eine nachfolgende LTP okkludiert. Eine Aktivierung von sogenannten „funktionell nicht aktiven Synapsen – silent synapses“<sup>2</sup> soll nach Ansicht der Autoren eine Erklärung bieten (Abegg *et al.*, 2004).

In der vorliegenden Arbeit konnte im Subikulum von Pilokarpin-behandelten Tieren nach hochfrequenter Reizung keine langanhaltende Potenzierung der synaptischen Antworten festgestellt werden. Stattdessen scheinen polysynaptisch latente Verbindungen mittels tetanischer Stimulation aktivierbar zu sein. In einigen Fällen waren diese polysynaptisch latenten Verbindungen *per se*, in anderen Fällen nach die Blockade der GABAergen Neurotransmission aktiv.

Miles und Wong konnten in intrazellulären Paarableitung von CA3 Pyramidenzellen zu einem sehr geringen Anteil (< 1%) polysynaptische Verbindungen im Kontrolltier nachweisen. Interessanterweise führte eine tetanische Stimulation zu

---

<sup>2</sup> „Stille Synapsen – silent synapses“ zeichnen sich durch die Abwesenheit von AMPA-Rezeptoren aus, die nach Induktion einer LTP in die postsynaptische Membran eingebaut werden können. Bei Ruhemembranpotential kann nach synaptischer Stimulation einer „stillen Synapse“ kein postsynaptisches Signal aufgezeichnet werden.

einer Aktivierung von synaptisch latenten Verbindungen und zum Auftreten von polysynaptischen Signalen (Miles & Wong, 1987b). Da die pharmakologische Blockade von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren denselben Effekt erzielte und den Prozentsatz polysynaptischer Verbindungen auf ungefähr 20% an hob, mutmaßten die Autoren, dass die Effizienz von rekurrenten inhibitorischen Verbindungen durch den Tetanus reduziert wird. Eine Verminderung der GABA<sub>A</sub>R-abhängigen Inhibition nach tetanischer Stimulation in Pilocarpin-behandelten Tieren im Subikulum kommt als Erklärung in der vorliegenden Arbeit nicht in Frage, da die Ableitungen unter pharmakologischer Blockade des GABA<sub>A</sub>R durchgeführt wurden.

An glyzinergen Neuronen des Goldfisches konnte ein ähnliches Phänomen beobachtet werden. Latente inhibitorische Verbindungen wurden nach tetanischer Reizung funktionell. Der Grund hierfür findet sich nach Ansicht der Autoren in der vorgeschalteten Zelle. Präsynaptische Terminalen sind nach ihrer Meinung nicht aktiv und können vor tetanischer Reizung keinen Transmitter freisetzen (Charpier *et al.*, 1995).

Die Aktivierung synaptisch latenter Verbindungen im Pilocarpin-behandelten Tier könnte auch auf pathologische axonale Sprossung im chronisch epileptischen Gewebe zurückzuführen sein. In einer Untersuchung der eigenen Arbeitsgruppe fand sich allerdings kein Unterschied in der Gesamtarborisierung zwischen subikulären Zellen von Kontrolltieren und Pilocarpin-behandelten Tieren. Ein signifikanter Unterschied wurde aber bei den Teilungspunkten der Dendriten festgestellt. So teilen sich Dendriten von Zellen der Kontrolltiere signifikant häufiger als die der Kontrolltiere (Knopp *et al.*, 2004). Ob dies in Zusammenhang steht mit den polysynaptischen Signalen, ist unklar. Ebenso unklar ist, ob sich, wenn auch nur zu einem geringen Prozentsatz, rekurrente Verschaltungen im Subikulum von Kontrolltieren nachweisen lässt.

## 5.6 Pathologische Plastizität im humanem Subikulum

Bislang gibt es nur wenige Untersuchungen zur Rolle des Subikulums im Rahmen der TLE. Im Gegensatz zu den Areae CA1 und CA3 findet sich im Subikulum meist nur ein sehr gering ausgeprägter Zellverlust. Auf Grund dieser Tatsache könnte dem Subikulum eine Schlüsselfunktion in der Generierung von Anfällen zukommen, da

ein intaktes Netzwerk eine notwendige Voraussetzung für die Generierung synchronisierter synaptischer Aktivität ist..

In der Tat konnte in den durchgeführten Untersuchungen in Hirnschnittpräparaten von Patienten mit pharmakoresistenter TLE im Subikulum spontane rhythmische Aktivität mit einer Frequenz von 0,75 bis 3 Hz aufgezeichnet werden. Diese Aktivität, bestehend aus EPSP/IPSP Sequenzen, wurde sowohl in sklerotischem (Ammonshornsklerose: AHS) wie auch in nicht sklerotischem Gewebe (Non-AHS) gefunden. In beiden Gruppen korrelierte die *in vitro* Aktivität sehr gut mit elektroenzephalografisch detektierter interiktaler Aktivität.

Ein Teil der Ergebnisse wurde zeitgleich von Cohen und Kollegen publiziert (Cohen *et al.*, 2002). Cohen *et al.* untersuchten allerdings lediglich Patienten mit einer bildmorphologisch diagnostizierten AHS. Eine histologische Aufarbeitung und eine Einordnung nach der neuropathologischen Klassifikation von Wyler erfolgte nicht. Unter Berücksichtigung der bildmorphologischen Diagnose folgerten Cohen *et al.*, dass eine Deafferenzierung des Subikulums einer erhöhten Anfallsbereitschaft verursacht. In einer kleinen Population von Zellen konnten Cohen *et al.* depolarisierende GABAerge Antworten nachweisen. Interneurone können, so die Autoren, Pyramidalzellen mittels des Neurotransmitters GABA erregen, die wiederum in einem Netzwerk weitere Pyramidalzellen, sowie Interneurone erregen können. Welche Mechanismen der Schrittmacherfunktion zu Grunde liegt, ist unklar. Depolarisierende GABAerge Signale waren bislang lediglich in juvenilem Gewebe nachgewiesen worden. Der Übergang von depolarisierenden zu hyperpolarisierenden GABA<sub>A</sub>R-vermittelten Antworten ist gekoppelt an die Expression des Kalium-Chlorid-Kotransporters KCC2 (Rivera *et al.*, 1999). In *in vitro* Epilepsie Modellen kann ungefähr ein bis drei Stunden nach Aktivitätsbeginn tatsächlich eine Verminderung des KCC2 nachgewiesen werden (Rivera *et al.*, 2004).

In der vorliegenden Studie konnte im Gegensatz zu der Arbeit von Cohen *et al.* nicht in allen Zellen interiktale Aktivität aufgezeichnet werden. Dies kann zwei Gründe haben. Zum einen könnten die nicht aktiven Zellen dieser Studie außerhalb des epileptischen Fokus gelegen haben, zum anderen könnte sich in dem untersuchten Hirnschnittpräparat kein Fokus befunden haben. Cohen und Kollegen haben die Größe des spontan aktiven Areals mit zwei mal drei Millimeter angegeben. Die resizierten Gewebestücke der hiesigen neurochirurgischen Klinik haben in der Regel eine Größe

von ungefähr zwei mal zwei Zentimeter, so dass *per se* nicht in jedem Hirnschnitt (500 µm Dicke) interiktale Aktivität gefunden werden kann.

In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls in Non-AHS Gewebe spontane Aktivität gefunden werden. Non-AHS Gewebe zeigt auch in den Wyler Graden W1 und W2 (siehe Einleitung) einen geringgradigen Zellverlust. Ob eine partielle Deafferenzierung des Subikulums ausreichend ist, oder ob es sich im Fall des Non-AHS Gewebes um eine grundlegend andere Aktivität handelt, ist unklar.

Bislang ist ebenso unklar, welche Rolle diese spontane, rhythmische Aktivität in der Pathogenese der TLE spielt. Schwartzkroin und Haglund konnten interiktale Aktivität auch im Kontrollgewebe von Affen nachweisen. Die Autoren hielten deswegen diese spontanen, rhythmischen Ereignisse als einen Marker epileptischen Gewebes für ungeeignet (Schwartzkroin & Haglund, 1986).

Weitere Studien müssen klären, inwieweit Schrittmacherzellen diese Aktivität generieren können und welche zellulären Prozesse dieser zugrunde liegen. Es bleibt zu hoffen, dass aus dem Verständnis der zellulären Prozesse Patienten mit einer TLE neue Wege in der Pharmakotherapie eröffnet werden können.

## 6. Zusammenfassung

Im Subikulum der Ratte finden sich zwei unterschiedliche Typen von Pyramidalzellen, die sich auf Grund ihres intrinsischen Entladungsverhaltens unterscheiden. Die Funktion dieser beiden Zelltypen hinsichtlich der synaptischer Neurotransmission ist unklar. Bursterzellen und regulär feuernde Zellen zeigten nach tetanischer Reizung ein unterschiedliches Ausmaß der LTP. Neben der zellspezifischen Ausprägung der LTP fanden sich mehrere Hinweise auf eine zielspezifische Projektion der Efferenzen der vorgeschalteten Area CA1. Die durchgeführten Experimente legen den Schluss nahe, dass Axone von Pyramidalzellen der Area CA1 selektiv auf subikuläre Pyramidenzellen projizieren und so den hippocampalen Informationsfluss steuern und regulieren können. NMDA-Rezeptoren auf beiden Seiten des synaptischen Spaltes spielen hier eine besondere Rolle. Präsynaptische NMDAR der Untereinheit NR2B scheinen an der LTP in Bursterzellen beteiligt zu sein und über einen vermehrten Kalziumeinstrom in die Präsynapse eine langanhaltende Erhöhung der Transmitterausschüttung herbeizuführen. Ebenso zeigten sich abhängig von der Zielzelle Hinweise auf eine unterschiedliche Aktivierung der präsynaptischen Adenylylcyclase-cAMP Kaskade.

In Pilocarpin-behandelten Tieren ließ sich nach hochfrequenter Reizung keine langanhaltende Potenzierung der synaptischen Antworten nachweisen. Stattdessen scheinen polysynaptisch latente Verbindungen mittels tetanischer Stimulation aktivierbar zu sein. In einigen Fällen waren diese polysynaptisch latenten Verbindungen *per se*, in anderen Fällen nach Blockade der GABAergen Neurotransmission aktiv.

In Hirnschnittpräparaten von Patienten mit pharmakoresistenter Temporallappenepilepsie konnte im Subikulum spontane rhythmische Aktivität mit einer Frequenz von 0,75 bis 3 Hz aufgezeichnet werden. Diese Aktivität, bestehend aus EPSP/IPSP Sequenzen, wurde sowohl in sklerotischem als auch in nicht sklerotischem Gewebe gefunden. In beiden Gruppen korrelierte die *in vitro* Aktivität sehr gut mit dem präoperativen Auftreten elektroenzephalografisch detektierter interiktaler Aktivität. Die Blockade GABAerger oder glutamaterger Neurotransmission hob die inhibitorische bzw. exzitatorische Aktivität auf. Dies legt den Schluss nahe, dass sowohl Interneurone wie Pyramidalzellen an der spontanen rhythmischen Aktivität beteiligt sind.

## ***Literaturverzeichnis***

Abegg, M. H., Savic, N., Ehrenguber, M. U., McKinney, R. A., & Gähwiler, B. H. (2004). Epileptiform activity in rat hippocampus strengthens excitatory synapses. *J. Physiol* **554**, 439-448.

Abraham, W. C. & Williams, J. M. (2003). Properties and mechanisms of LTP maintenance. *Neuroscientist*. **9**, 463-474.

Amaral, D. G. & Witter, M. P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* **31**, 571-591.

Beck, H., Goussakov, I. V., Lie, A., Helmstaedter, C., & Elger, C. E. (2000). Synaptic plasticity in the human dentate gyrus. *J Neurosci*. **20**, 7080-7086.

Behr, J., Empson, R. M., Schmitz, D., Gloveli, T., & Heinemann, U. (1996). Electrophysiological properties of rat subicular neurons in vitro. *Neurosci.Lett*. **220**, 41-44.

Behr, J., Gloveli, T., & Heinemann, U. (2000). Kindling induces a transient suppression of afterhyperpolarization in rat subicular neurons. *Brain Res* **867**, 259-264.

Bekkers, J. M. & Stevens, C. F. (1990). Presynaptic mechanism for long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **346**, 724-729.

Bliss, T. V. & Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**, 31-39.

Bliss, T. V. & Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol* **232**, 331-356.

- Boeijinga, P. H. & Boddeke, H. W. (1996). Activation of 5-HT<sub>1B</sub> receptors suppresses low but not high frequency synaptic transmission in the rat subicular cortex in vitro. *Brain Res.* **721**, 59-65.
- Bortolotto, Z. A., Clarke, V. R., Delany, C. M., Parry, M. C., Smolders, I., Vignes, M., Ho, K. H., Miu, P., Brinton, B. T., Fantaske, R., Ogden, A., Gates, M., Ornstein, P. L., Lodge, D., Bleakman, D., & Collingridge, G. L. (1999). Kainate receptors are involved in synaptic plasticity. *Nature* **402**, 297-301.
- Bortolotto, Z. A., Lauri, S., Isaac, J. T., & Collingridge, G. L. (2003). Kainate receptors and the induction of mossy fibre long-term potentiation. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* **358**, 657-666.
- Buller, A. L. & Monaghan, D. T. (1997). Pharmacological heterogeneity of NMDA receptors: characterization of NR1a/NR2D heteromers expressed in *Xenopus* oocytes. *Eur.J Pharmacol.* **320**, 87-94.
- Carlson, G., Wang, Y., & Alger, B. E. (2002). Endocannabinoids facilitate the induction of LTP in the hippocampus. *Nat.Neurosci.* **5**, 723-724.
- Casado, M., Isope, P., & Ascher, P. (2002). Involvement of presynaptic N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar long-term depression. *Neuron* **33**, 123-130.
- Castillo, P. E., Janz, R., Sudhof, T. C., Tzounopoulos, T., Malenka, R. C., & Nicoll, R. A. (1997). Rab3A is essential for mossy fibre long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **388**, 590-593.
- Castillo, P. E., Schoch, S., Schmitz, F., Sudhof, T. C., & Malenka, R. C. (2002). RIM1alpha is required for presynaptic long-term potentiation. *Nature* **415**, 327-330.
- Castro-Alamancos, M. A. & Calcagnotto, M. E. (1999). Presynaptic long-term potentiation in corticothalamic synapses. *J.Neurosci.* **19**, 9090-9097.
- Cavalheiro, E. A. (1995). The pilocarpine model of epilepsy. *Ital.J Neurol.Sci.* **16**, 33-37.

- Charpier, S., Behrends, J. C., Triller, A., Faber, D. S., & Korn, H. (1995). "Latent" inhibitory connections become functional during activity-dependent plasticity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**, 117-120.
- Chevaleyre, V. & Castillo, P. E. (2002). Assessing the role of Ih channels in synaptic transmission and mossy fiber LTP. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**, 9538-9543.
- Cohen, I., Navarro, V., Clemenceau, S., Baulac, M., & Miles, R. (2002). On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. *Science* **298**, 1418-1421.
- Collingridge, G. L., Kehl, S. J., & McLennan, H. (1983). The antagonism of amino acid-induced excitations of rat hippocampal CA1 neurones in vitro. *J.Physiol* **334**, 19-31.
- Commins, S., Gigg, J., Anderson, M., & O'Mara, S. M. (1998). The projection from hippocampal area CA1 to the subiculum sustains long-term potentiation. *Neuroreport* **9**, 847-850.
- Contractor, A., Swanson, G., & Heinemann, S. F. (2001). Kainate receptors are involved in short- and long-term plasticity at mossy fiber synapses in the hippocampus. *Neuron* **29**, 209-216.
- Corkin, S. (2002). What's new with the amnesic patient H.M.? *Nat.Rev.Neurosci.* **3**, 153-160.
- Cull-Candy, S., Brickley, S., & Farrant, M. (2001). NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr.Opin.Neurobiol.* **11**, 327-335.
- Debanne, D., Guerineau, N. C., Gahwiler, B. H., & Thompson, S. M. (1996). Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: quantal fluctuation affects subsequent release. *J Physiol* **491 ( Pt 1)**, 163-176.
- Dudek, F. E. & Spitz, M. (1997). Hypothetical mechanisms for the cellular and neurophysiologic basis of secondary epileptogenesis: proposed role of synaptic reorganization. *J.Clin.Neurophysiol.* **14**, 90-101.



- Duguid, I. C. & Smart, T. G. (2004). Retrograde activation of presynaptic NMDA receptors enhances GABA release at cerebellar interneuron-Purkinje cell synapses. *Nat.Neurosci.* **7**, 525-533.
- Faber, D. S. & Korn, H. (1991). Applicability of the coefficient of variation method for analyzing synaptic plasticity. *Biophys.J* **60**, 1288-1294.
- Farrant, M. & Cull-Candy, S. G. (1991). Excitatory amino acid receptor-channels in Purkinje cells in thin cerebellar slices. *Proc.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* **244**, 179-184.
- Golding, N. L., Staff, N. P., & Spruston, N. (2002). Dendritic spikes as a mechanism for cooperative long-term potentiation. *Nature* **418**, 326-331.
- Greene, J. R., Lin, H., Mason, A. J., Johnson, L. R., & Totterdell, S. (1997). Differential expression of NADPH-diaphorase between electrophysiologically-defined classes of pyramidal neurons in rat ventral subiculum, in vitro. *Neuroscience* **80**, 95-104.
- Greene, J. R. & Mason, A. (1996). Neuronal diversity in the subiculum: correlations with the effects of somatostatin on intrinsic properties and on GABA-mediated IPSPs in vitro. *J Neurophysiol.* **76**, 1657-1666.
- Greene, J. R. & Totterdell, S. (1997). Morphology and distribution of electrophysiologically defined classes of pyramidal and nonpyramidal neurons in rat ventral subiculum in vitro. *J Comp Neurol.* **380**, 395-408.
- Grunwald, T., Lehnertz, K., Heinze, H. J., Helmstaedter, C., & Elger, C. E. (1998). Verbal novelty detection within the human hippocampus proper. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 3193-3197.
- Hesse, G. W. & Teyler, T. J. (1976). Reversible loss of hippocampal long term potentiation following electronconvulsive seizures. *Nature* **264**, 562-564.
- Hoshi, T., Garber, S. S., & Aldrich, R. W. (1988). Effect of forskolin on voltage-gated K<sup>+</sup> channels is independent of adenylate cyclase activation. *Science* **240**, 1652-1655.

- Houser, C. R. & Esclapez, M. (1996). Vulnerability and plasticity of the GABA system in the pilocarpine model of spontaneous recurrent seizures. *Epilepsy Res.* **26**, 207-218.
- Hrabetova, S., Serrano, P., Blace, N., Tse, H. W., Skifter, D. A., Jane, D. E., Monaghan, D. T., & Sacktor, T. C. (2000). Distinct NMDA receptor subpopulations contribute to long-term potentiation and long-term depression induction. *J Neurosci.* **20**, RC81.
- Huang, C. C. & Hsu, K. S. (2003). Reexamination of the role of hyperpolarization-activated cation channels in short- and long-term plasticity at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuropharmacology* **44**, 968-981.
- Jones, M. V. & Westbrook, G. L. (1996). The impact of receptor desensitization on fast synaptic transmission. *Trends Neurosci.* **19**, 96-101.
- Knopp, A., Kivi, A., Wozny, C., Heinemann, U., & Behr, J. (2004). Alterations of subicular network properties in the pilocarpine-model of temporal lobe epilepsy. *Biophysical Society Annual Meeting 2004* Pos-L77.
- Kokaia, M. (2000). Long-term potentiation of single subicular neurons in mice. *Hippocampus* **10**, 684-692.
- Kullmann, D. M., Asztely, F., & Walker, M. C. (2000). The role of mammalian ionotropic receptors in synaptic plasticity: LTP, LTD and epilepsy. *Cell Mol.Life Sci.* **57**, 1551-1561.
- Laurie, D. J. & Seeburg, P. H. (1994). Ligand affinities at recombinant N-methyl-D-aspartate receptors depend on subunit composition. *Eur.J Pharmacol.* **268**, 335-345.
- Lisman, J. E. (1997). Bursts as a unit of neural information: making unreliable synapses reliable. *Trends Neurosci.* **20**, 38-43.
- Livingstone, M. S., Freeman, D. C., & Hubel, D. H. (1996). Visual responses in V1 of freely viewing monkeys. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* **61**, 27-37.

- Llano, I., Marty, A., Armstrong, C. M., & Konnerth, A. (1991). Synaptic- and agonist-induced excitatory currents of Purkinje cells in rat cerebellar slices. *J.Physiol* **434**, 183-213.
- Lopez, d. A. & Sah, P. (2003). Development and subunit composition of synaptic NMDA receptors in the amygdala: NR2B synapses in the adult central amygdala. *J.Neurosci.* **23**, 6876-6883.
- Maccaferri, G., Toth, K., & McBain, C. J. (1998). Target-specific expression of presynaptic mossy fiber plasticity. *Science* **279**, 1368-1370.
- MacDermott, A. B., Role, L. W., & Siegelbaum, S. A. (1999). Presynaptic ionotropic receptors and the control of transmitter release. *Annu.Rev.Neurosci.* **22**, 443-485.
- Malenka, R. C. & Nicoll, R. A. (1999). Long-term potentiation--a decade of progress? *Science* **285**, 1870-1874.
- Malinow, R. & Tsien, R. W. (1990). Presynaptic enhancement shown by whole-cell recordings of long-term potentiation in hippocampal slices. *Nature* **346**, 177-180.
- Manabe, T., Wyllie, D. J., Perkel, D. J., & Nicoll, R. A. (1993). Modulation of synaptic transmission and long-term potentiation: effects on paired pulse facilitation and EPSC variance in the CA1 region of the hippocampus. *J Neurophysiol.* **70**, 1451-1459.
- Manzoni, O. J., Castillo, P. E., & Nicoll, R. A. (1995). Pharmacology of metabotropic glutamate receptors at the mossy fiber synapses of the guinea pig hippocampus. *Neuropharmacology* **34**, 965-971.
- Mason, A. (1993). Electrophysiology and burst-firing of rat subicular pyramidal neurons in vitro: a comparison with area CA1. *Brain Res.* **600**, 174-178.
- Mattia, D., Kawasaki, H., & Avoli, M. (1997). In vitro electrophysiology of rat subicular bursting neurons. *Hippocampus* **7**, 48-57.

- Mello, L. E. & Covolan, L. (1996). Spontaneous seizures preferentially injure interneurons in the pilocarpine model of chronic spontaneous seizures. *Epilepsy Res.* **26**, 123-129.
- Mellor, J. & Nicoll, R. A. (2001). Hippocampal mossy fiber LTP is independent of postsynaptic calcium. *Nat. Neurosci.* **4**, 125-126.
- Mellor, J., Nicoll, R. A., & Schmitz, D. (2002). Mediation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by presynaptic Ih channels. *Science* **295**, 143-147.
- Menendez, d. I. P., Suarez, F., & Pozo, M. A. (2002). The effect of different morphological sampling criteria on the fraction of bursting cells recorded in the rat subiculum in vitro. *Neurosci.Lett.* **322**, 49-52.
- Miles, R. & Wong, R. K. (1987a). Inhibitory control of local excitatory circuits in the guinea-pig hippocampus. *J.Physiol* **388**, 611-629.
- Miles, R. & Wong, R. K. (1987b). Latent synaptic pathways revealed after tetanic stimulation in the hippocampus. *Nature* **329**, 724-726.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D. J., Sakmann, B., & Seeburg, P. H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* **12**, 529-540.
- Morris, R. G., Anderson, E., Lynch, G. S., & Baudry, M. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* **319**, 774-776.
- Morris, R. G., Schenk, F., Tweedie, F., & Jarrard, L. E. (1990). Ibotenate Lesions of Hippocampus and/or Subiculum: Dissociating Components of Allocentric Spatial Learning. *Eur.J Neurosci.* **2**, 1016-1028.
- Nikonenko, I., Jourdain, P., Alberi, S., Toni, N., & Muller, D. (2002). Activity-induced changes of spine morphology. *Hippocampus* **12**, 585-591.

- O'Dell, T. J., Hawkins, R. D., Kandel, E. R., & Arancio, O. (1991). Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**, 11285-11289.
- O'Mara, S. M., Commins, S., Anderson, M., & Gigg, J. (2001). The subiculum: a review of form, physiology and function. *Prog.Neurobiol.* **64**, 129-155.
- Pike, F. G., Meredith, R. M., Olding, A. W., & Paulsen, O. (1999). Rapid report: postsynaptic bursting is essential for 'Hebbian' induction of associative long-term potentiation at excitatory synapses in rat hippocampus. *J Physiol* **518 ( Pt 2)**, 571-576.
- Prince, D. A. (1997). Epilepsy and the too-well-connected brain. *Nat.Med.* **3**, 957-958.
- Riedel, G. & Reymann, K. G. (1996). Metabotropic glutamate receptors in hippocampal long-term potentiation and learning and memory. *Acta Physiol Scand.* **157**, 1-19.
- Riout-Pedotti, M. S., Friedman, D., & Donoghue, J. P. (2000). Learning-induced LTP in neocortex. *Science* **290**, 533-536.
- Rivera, C., Voipio, J., Payne, J. A., Ruusuvuori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., Pirvola, U., Saarma, M., & Kaila, K. (1999). The K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* **397**, 251-255.
- Rivera, C., Voipio, J., Thomas-Crusells, J., Li, H., Emri, Z., Sipila, S., Payne, J. A., Minichiello, L., Saarma, M., & Kaila, K. (2004). Mechanism of activity-dependent downregulation of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2. *J.Neurosci.* **24**, 4683-4691.
- Rodrigues, S. M., Schafe, G. E., & LeDoux, J. E. (2001). Intra-amygdala blockade of the NR2B subunit of the NMDA receptor disrupts the acquisition but not the expression of fear conditioning. *J.Neurosci.* **21**, 6889-6896.
- Rosenblum, K., Berman, D. E., Hazvi, S., Lamprecht, R., & Dudai, Y. (1997). NMDA receptor and the tyrosine phosphorylation of its 2B subunit in taste learning in the rat insular cortex. *J.Neurosci.* **17**, 5129-5135.

- Sah, P. (1996).  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *Trends Neurosci.* **19**, 150-154.
- Salin, P. A., Malenka, R. C., & Nicoll, R. A. (1996). Cyclic AMP mediates a presynaptic form of LTP at cerebellar parallel fiber synapses. *Neuron* **16**, 797-803.
- Schmitz, D., Mellor, J., Breustedt, J., & Nicoll, R. A. (2003). Presynaptic kainate receptors impart an associative property to hippocampal mossy fiber long-term potentiation. *Nat. Neurosci.* **6**, 1058-1063.
- Schmitz, D., Mellor, J., & Nicoll, R. A. (2001). Presynaptic kainate receptor mediation of frequency facilitation at hippocampal mossy fiber synapses. *Science* **291**, 1972-1976.
- Schwartzkroin, P. A. & Haglund, M. M. (1986). Spontaneous rhythmic synchronous activity in epileptic human and normal monkey temporal lobe. *Epilepsia* **27**, 523-533.
- Scoville, W. B. & Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurochem.* **20**, 11-21.
- Sheng, M., Cummings, J., Roldan, L. A., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (1994). Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* **368**, 144-147.
- Solger, J., Wozny, C., Manahan-Vaughan, D., & Behr, J. (2004). Distinct mechanisms of bidirectional activity-dependent synaptic plasticity in superficial and deep layers of rat entorhinal cortex. *Eur. J. Neurosci.* **19**, 2003-2007.
- Staff, N. P., Jung, H. Y., Thiagarajan, T., Yao, M., & Spruston, N. (2000). Resting and active properties of pyramidal neurons in subiculum and CA1 of rat hippocampus. *J. Neurophysiol.* **84**, 2398-2408.
- Stanford, I. M., Traub, R. D., & Jefferys, J. G. (1998). Limbic gamma rhythms. II. Synaptic and intrinsic mechanisms underlying spike doublets in oscillating subicular neurons. *J. Neurophysiol.* **80**, 162-171.

Stewart, M. (1997). Antidromic and orthodromic responses by subicular neurons in rat brain slices. *Brain Res* **769**, 71-85.

Stewart, M. & Wong, R. K. (1993). Intrinsic properties and evoked responses of guinea pig subicular neurons in vitro. *J Neurophysiol.* **70**, 232-245.

Szinyei, C., Stork, O., & Pape, H. C. (2003). Contribution of NR2B subunits to synaptic transmission in amygdaloid interneurons. *J.Neurosci.* **23**, 2549-2556.

Tang, Y. P., Shimizu, E., Dube, G. R., Rampon, C., Kerchner, G. A., Zhuo, M., Liu, G., & Tsien, J. Z. (1999). Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* **401**, 63-69.

Taube, J. S. (1993). Electrophysiological properties of neurons in the rat subiculum in vitro. *Exp.Brain Res* **96**, 304-318.

Tsien, R. W. & Malinow, R. (1990). Long-term potentiation: presynaptic enhancement following postsynaptic activation of Ca(++)-dependent protein kinases. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* **55**, 147-159.

Voronin, L. L. (1993). On the quantal analysis of hippocampal long-term potentiation and related phenomena of synaptic plasticity. *Neuroscience* **56**, 275-304.

Weisskopf, M. G., Castillo, P. E., Zalutsky, R. A., & Nicoll, R. A. (1994). Mediation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by cyclic AMP. *Science* **265**, 1878-1882.

Williams, K. (1993). Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Mol.Pharmacol.* **44**, 851-859.

Witter, M. P. & Groenewegen, H. J. (1990). The subiculum: cytoarchitectonically a simple structure, but hodologically complex. *Prog.Brain Res* **83**, 47-58.

- Woodhall, G., Evans, D. I., Cunningham, M. O., & Jones, R. S. (2001). NR2B-containing NMDA autoreceptors at synapses on entorhinal cortical neurons. *J Neurophysiol.* **86**, 1644-1651.
- Wyler, A. R., Dohan Jr., F. C., Schweitzer, J. B., & Berry III, A. D. (1992). A Grading System for Mesial Temporal Pathology (Hippocampal Sclerosis) from Anterior Temporal Lobectomy. *J Epilepsy* **5**, 220-225.
- Xia, Z. G., Refsdal, C. D., Merchant, K. M., Dorsa, D. M., & Storm, D. R. (1991). Distribution of mRNA for the calmodulin-sensitive adenylate cyclase in rat brain: expression in areas associated with learning and memory. *Neuron* **6**, 431-443.
- Yaari, Y. & Beck, H. (2002). "Epileptic neurons" in temporal lobe epilepsy. *Brain Pathol.* **12**, 234-239.
- Yeckel, M. F., Kapur, A., & Johnston, D. (1999). Multiple forms of LTP in hippocampal CA3 neurons use a common postsynaptic mechanism. *Nat. Neurosci.* **2**, 625-633.
- Yuste, R. & Bonhoeffer, T. (2001). Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 1071-1089.
- Zalutsky, R. A. & Nicoll, R. A. (1990). Comparison of two forms of long-term potentiation in single hippocampal neurons. *Science* **248**, 1619-1624.
- Zola-Morgan, S., Squire, L. R., & Amaral, D. G. (1986). Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J Neurosci.* **6**, 2950-2967.
- Zola-Morgan, S., Squire, L. R., Rempel, N. L., Clower, R. P., & Amaral, D. G. (1992). Enduring memory impairment in monkeys after ischemic damage to the hippocampus. *J Neurosci.* **12**, 2582-2596.
- Zucker, R. S. & Regehr, W. G. (2002). Short-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol* **64**, 355-405.



## Anhang

### Patientendaten humanes Gewebe

| Nummer<br>Patient | Alter | Geschlecht | Dauer<br>(Jahre) | Grading<br>Wyler | Pathologie |
|-------------------|-------|------------|------------------|------------------|------------|
| A 1               | 20    | W          | 9                | W4               | AHS        |
| A 2               | 36    | W          | seit Kindheit    | W4               | AHS        |
| A 3               | 34    | M          | 24               | W4               | AHS        |
| A 4               | 23    | W          | 15               | W4               | AHS        |
| A 5               | 25    | M          | 24               | W4               | AHS        |
| A 6               | 34    | W          | 33               | W4               | AHS        |
| A 7               | 67    | M          | 39               | W3               | AHS        |

|     |    |   |    |    |             |
|-----|----|---|----|----|-------------|
| N 1 | 18 | W | 13 | W2 | AHS         |
| N 2 | 28 | M | 11 | W0 | Astrocytoma |
| N 3 | 15 | M | 2  | W2 | AHS         |
| N 4 | 46 | M | 21 | W2 | AHS         |
| N 5 | 32 | W | 30 | W2 | AHS         |
| N 6 | 28 | M | 2  | W2 | Astrocytoma |

#### Abkürzungen:

A1: AHS Gewebe 1, N1: Non-AHS Gewebe 1, W: Weiblich, M: Männlich. AHS: Ammonshornsklerose.

**Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere eidesstattlich, dass ich die vorliegende Dissertation ohne unzulässige Hilfe verfasst habe. Wissenschaftliche Kooperationen habe ich gekennzeichnet, Hilfsmittel und Literatur angegeben.

Berlin, den 30.06.2004

Christian Wozny

## Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn PD Dr. Joachim Behr für die hervorragende und freundschaftliche Betreuung der vorliegenden Arbeit, die wissenschaftlichen Freiräume und nicht zuletzt die wissenschaftlichen Auseinandersetzungen. Die oft nicht endenden, und meist lebhaft geführten Diskussionen haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Uwe Heinemann danke ich ebenfalls für die Betreuung und sein stetiges Interesse am Gelingen dieser Arbeit. Den Damen und Herren Dr. Anatol Kivi, Jörg Solger, Dr. Andreas Knopp, Dr. Dietmar Schmitz und Nadine Buck danke ich für viele anregende Diskussionen und gemeinsamen Stunden, nicht nur im Labor. Frau Susanne Walden danke ich herzlich für Ihre Unterstützung in der alltäglichen Arbeit, Herrn Dr. Thomas-Nicolas Lehmann danke ich für die Bereitstellung des humanen Gewebes, Herrn Dr. Christoph Dehnicke für die Auswertung der EEG – Ableitungen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, meinen Eltern, und besonders bei Dorte vom Endt bedanken für Ihre immer währende Unterstützung.

Vielen herzlichen Dank.

## Publikationsliste

**Wozny, C.**, Kivi, A., Schmitz, D., & Behr, J. NR2B-dependent target-specific long-term potentiation at CA1-subiculum synapses. (submitted).

**Wozny, C.**, Gabriel, S., Jandova, K., Schulze, K., Heinemann, U., & Behr, J. (2004). The entorhinal cortex entrains epileptiform activity in area CA1 in pilocarpine-treated rats. *Neurobiol Dis* (under revision).

Knopp, A., Kivi, A., **Wozny, C.**, Heinemann, U. & Behr, J. (2004). Alterations of subicular network properties in the pilocarpine-model of temporal lobe epilepsy. *J Comp Neurol* (under revision).

Behr, J., **Wozny, C.** & Knopp, A. (2004). The subiculum: a potential site of ictogenesis in human temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* (in press).

Solger, J., **Wozny, C.**, Manahan-Vaughan, D. & Behr, J. (2004). Distinct mechanisms of bidirectional activity-dependent synaptic plasticity in superficial and deep layers of rat entorhinal cortex. *Eur J Neurosci* **19**: 2003-2007.

**Wozny, C.**, Kivi, A., Lehmann, T.-N., Dehnicke, C., Heinemann, U. & Behr, J. (2003). Comment on "On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro". *Science* **301**, 463.

## Symposiumsbeiträge

Knopp, A., Kivi, A., **Wozny, C.**, Heinemann, U. & Behr, J. (2004). Alterations of subicular network properties in the pilocarpine-model of temporal lobe epilepsy. *Biophysical Society Annual Meeting 2004*, Pos-L77.

**Wozny, C.**, Kivi, A., Lehmann, T.-N., Heinemann, U. & Behr, J. (2003). The subiculum contributes to interictal activity in human temporal lobe epilepsy. *International Symposium "Molecular Basis of CNS disorders"*, SFB-TR3 and SFB 400. Bonn.

**Wozny, C.**, Kivi, A., Lehmann, T.-N., Heinemann, U. & Behr, J. (2002). Electrophysiological properties of subicular neurons recorded in human epileptic tissue. *FENS Abstr.* vol. 1, A218.25 (Abstract).

Kivi, A., **Wozny, C.**, Heinemann, U. & Behr, J. (2002). Cell- and pathway-specific synaptic properties in the rat subiculum. *FENS Abstr.* vol. 1, A081.4 (Abstract).

**Wozny, C.**, Heinemann, U. & Behr, J. (2001). Cell-specific synaptic plasticity in the rat subiculum in vitro. *12th European Students Conference Berlin 2001* (Abstract).

**Wozny, C.**, Heinemann, U. & Behr, J. (2001). Cell-specific synaptic plasticity in the rat subiculum in vitro. Neurobiologentagung, Göttingen. In N. Elsner, G. W. Kreutzberg (Eds.) *Proceedings of the 28th Göttingen Neurobiology Conference 2001*, Vol. II, Thieme, Stuttgart, New York, P 630 (Abstract).

**Wozny, C.**, Heinemann, U., Gabriel S., & Behr, J. (2000). The entorhinal cortex entrains epileptiform activity in area CA1 in a model of temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci* 12 (Supplement 11), P 102.02 (Abstract).